



**Departamento de  
Patología Animal**

**Universidad** Zaragoza

# **Situación epidemiológica de la Oishmaniosis en perros asintomáticos en zona endémica**

**Patricia Sebastián Marcos**

Trabajo de Fin de Máster de Iniciación a la Investigación  
en Ciencias Veterinarias

Junio 2012





**Departamento de  
Patología Animal**  
**Universidad Zaragoza**

Dr. IGNACIO DE BLAS GIRAL, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, y Dr. NABIL HALAIHEL KASSAB, Profesor Asociado del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, como Directores,

CERTIFICAN:

Que D<sup>a</sup> PATRICIA SEBASTIÁN MARCOS ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su Trabajo de Fin de Máster de Iniciación a la Investigación en Ciencias Veterinarias titulado " Situación epidemiológica de la leishmaniosis en perros asintomáticos en zona endémica " que se ajusta con la temática presentada y cumple las condiciones exigidas para optar al Grado de Máster en la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, firmamos el presente certificado en Zaragoza a veintiocho de junio de dos mil doce.

Dr. Ignacio de Blas Giral

Dr. Nabil Halaihel Kassab



# Agradecimientos

---

La realización de este proyecto no hubiera sido posible sin la ayuda de distintas personas, y creo que todas ellas merecen una mención.

En primer lugar quiero agradecer este trabajo a mis directores Nacho y Nabil.

A Nacho porque aunque todas las personas que citaré a continuación han sido necesarias para poder terminar este trabajo, si no fuese por ti ni siquiera se habría empezado. Me has enseñado muchísimo: epidemiología, estadística y casi cualquier cosa, por que yo creo que sabes de todo. Siempre me has escuchado y me parece que te debo al menos unos mil millones de gracias.

A Nabil, gracias por enseñarme a trabajar en un laboratorio y a pensar el porqué de cada paso. He aprendido mucho gracias a tu gran bagaje profesional. Han sido muchas horas pero creo que las hemos aprovechado.

Agradecer a toda la Unidad de Enfermedades Infecciosas por acogerme entre vosotros, me habéis hecho sentir realmente a gusto durante todo el desarrollo del trabajo. Pepe, Olivia, Imanol y Tania. Gracias a Héctor por tu inestimable compañía en el laboratorio y a la hora de interpretar los liosos resultados; y a Ana por toda tu ayuda con la encuesta y estadística. Ha sido un placer trabajar con todos vosotros.

A mi familia y amigos por soportar oírme hablar de *Leishmania* por aquí y por allá estos meses.

Gracias a todos los miembros de la C.V. Miralbuena por querer colaborar y proporcionarme el material para el desarrollo de este trabajo. A David y Maite por permitirme estar en vuestra clínica y seguir formándome en el campo de la medicina veterinaria. A Noelia por tu ayuda.

Y por supuesto a mis queridas Itziar y Rosana, por que sencillamente sois las mejores. Gracias por ayudarme en la recogida de muestras, enseñarme todo el tiempo, discutir conmigo los resultados, pero sobre todo por ser unas buenas amigas. Lo he pasado genial con las dos y realmente espero que os guste mi trabajo, porque sois parte esencial en él.

Gracias a la empresa Alquizvetek S.L. por proporcionar el material para la realización de las qPCR y querer desarrollar esta idea.

Y finalmente gracias a todos quienes leáis este trabajo, está hecho con la mejor intención y lo mejor posible, no obstante como dijo Albert Einstein: *“Una velada en que todos los presentes estén absolutamente de acuerdo es una velada perdida.”*



# Índice general

---

Índice general .....	I
Índice de tablas .....	III
Índice de figuras .....	V
Resumen .....	VII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Leishmaniosis .....	3
2.1.1. Etiología .....	3
2.1.2. Ciclo biológico .....	4
2.2. Cuadro clínico en perros .....	6
2.2.1. Mecanismos patogénicos .....	6
2.2.2. Sintomatología en el perro .....	7
2.2.3. Tratamiento y métodos de prevención .....	9
2.2.3.1. Tratamiento .....	9
2.2.3.2. Métodos de prevención .....	10
2.3. Técnicas de diagnóstico .....	12
2.3.1. Diagnóstico de Leishmaniosis .....	12
2.3.2. Técnicas Indirectas .....	12
2.3.3. Técnicas Directas .....	15
2.3.3.1. Generalidades .....	15
2.3.3.2. PCR en Tiempo Real (qPCR) .....	16
2.3.3.3. Ventajas de la qPCR frente a la IFI .....	20
2.4. Estudios sobre la prevalencia de Leishmaniosis .....	21

3. OBJETIVOS .....	23
3.1. Objetivo principal .....	23
3.2. Objetivo secundario .....	23
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
4.1. Descripción del estudio .....	25
4.1.1. Área de estudio .....	25
4.1.2. Periodo de estudio .....	26
4.1.3. Selección de los participantes .....	26
4.1.4. Diseño del estudio .....	27
4.1.5. Extracción de sangre .....	27
4.2. Técnicas diagnósticas .....	28
4.2.1. Diagnóstico por IFI .....	28
4.2.2. Diagnóstico por qPCR .....	28
4.3. Encuestas Epidemiológicas .....	31
4.4. Análisis estadístico y epidemiológico .....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
5.1. Descripción de la muestra seleccionada .....	33
5.2. Concordancia diagnóstica .....	36
5.3. Prevalencias de Leishmaniosis .....	37
5.3.1. Asociación con las variables intrínsecas .....	37
5.3.2. Asociación con las variables extrínsecas .....	41
5.3.3. Asociación signos clínicos .....	46
6. CONCLUSIONES .....	49
7. BIBLIOGRAFÍA .....	51
ANEXO .....	59



## Índice de tablas

---

Tabla 1. Protocolo utilizado en la realización de la qPCR .....	31
Tabla 2. Distribución del sexo estratificada por la edad (n=98) .....	33
Tabla 3. Frecuencia de esterilización estratificada por sexo (n=98) .....	33
Tabla 4. Caracterización del peso (kg) (media $\pm$ DS) según el sexo (n=98) .....	33
Tabla 5. Distribución de la muestra por talla .....	34
Tabla 6. Distribución de las capas en función de la longitud del pelo .....	34
Tabla 7. Distribución de la muestra según la zona de residencia .....	34
Tabla 8. Distribución de los animales encuestados según el alojamiento .....	35
Tabla 9. Desplazamientos a otros lugares de los animales encuestados .....	35
Tabla 10. Horarios de paseo de los animales encuestados .....	35
Tabla 11. Distribución de animales según la utilización de repelentes .....	36
Tabla 12. Concordancia Diagnóstica entre IFI y qPCR .....	36
Tabla 13. Prevalencias y cargas parasitarias de los perros muestreados (n= 98) .....	37
Tabla 14. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) de los perros positivos por qPCR .....	37
Tabla 15a. Prevalencias (%) estratificadas según la edad .....	38
Tabla 15b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas según la edad .....	38
Tabla 16a. Prevalencias aparentes estratificadas según el sexo .....	39
Tabla 16b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas según el sexo .....	39
Tabla 17a. Distribución de positivos estratificada por la talla .....	39
Tabla 17b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificada por la talla .....	40
Tabla 18a. Distribución de positivos estratificada por la longitud del pelo .....	40
Tabla 18b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificada por la longitud del pelo .....	40
Tabla 19a. Distribución de positivos estratificada por el color del pelo .....	41
Tabla 19b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificada por el color del pelo .....	41
Tabla 20a. Prevalencias estratificadas según el uso de pipeta .....	42

Tabla 20b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas según el uso de pipeta .....	42
Tabla 21a. Prevalencias estratificadas según el uso de collar .....	43
Tabla 21b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas según el uso de collar .....	43
Tabla 22a. Prevalencias estratificadas según hora de paseo .....	43
Tabla 22b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas según horario de paseo .....	44
Tabla 23a. Prevalencias estratificadas según estancias .....	44
Tabla 23b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas según estancias .....	45
Tabla 24a. Prevalencias estratificadas según el tipo de alojamiento .....	45
Tabla 24b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas según el tipo de alojamiento .....	45
Tabla 25. Frecuencia de linfadenopatías .....	46
Tabla 26. Frecuencia de distintos signos clínicos .....	46
Tabla 27. Distribución de la muestra en función de la condición corporal .....	47
Tabla 28a. Distribución de positivos estratificada por la sintomatología .....	47
Tabla 28b. Cargas parasitarias (media $\pm$ SD) estratificadas estratificada por la sintomatología .....	48

# Índice de figuras

---

Figura 1. Amastigotes de <i>L. infantum</i> dentro de un macrófago .....	4
Figura 2. Promastigotes de <i>L. infantum</i> .....	4
Figura 3. Hembra de <i>P. perniciosus</i> .....	5
Figura 4. Esquema del ciclo de Leishmaniosis .....	6
Figura 5. Dermatitis exfoliativa .....	8
Figura 6. Cara de payaso .....	8
Figura 7. Úlcera en la cara dorsal de la muñeca .....	8
Figura 8. Proteinograma característico de LC .....	9
Figura 9. Collar con deltametrina (Scalibour) .....	11
Figura 10. Pipetas de Imidacloprid y Permetrina (Advantix) .....	11
Figura 11. Domperidona (Leishguard) .....	11
Figura 12. Vacuna Canileish. ....	11
Figura 13. Diagnóstico positivo mediante IFI para <i>L. infantum</i> .....	13
Figura 14. Diagnóstico negativo mediante IFI para <i>L. infantum</i> .....	13
Figura 15. Fases de la qPCR .....	18
Figura 16. Relación entre la escala logarítmica y los ciclos de replicación .....	19
Figura 17. Presentación de distintas curvas de fusión .....	19
Figura 18. Curva patrón .....	20
Figura 19. Distritos de la ciudad de Zaragoza .....	25
Figura 20. Zonas incluidas en el estudio .....	26



## Resumen

---

La leishmaniosis canina (LC) es una zoonosis que ha sido estudiada con gran énfasis por veterinarios durante los últimos años, cuyo principal reservorio es el perro, y que se estima afecta actualmente a dos millones y medio de perros en el suroeste de Europa.

Hasta la actualidad se ha estado estimando la prevalencia de esta enfermedad mediante estudios serológicos, los cuales han subestimado la prevalencia de la infección.

Con el reciente desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular, se está descubriendo que una gran proporción de animales asintomáticos y serológicamente negativos son portadores de este parásito en sangre, por lo que pueden transmitir la infección.

En este estudio realizado sobre 98 perros asintomáticos de un área endémica de LC, se ha estimado la prevalencia actual de infectados mediante IFI y qPCR en sangre, diagnosticando a los animales entre 3 y 5 meses después de la época de exposición al vector. Se han obtenido resultados que indican que la prevalencia por qPCR (58,16%) es sustancialmente mayor a la estimada por IFI (8,16%) lo cual nos da a entender que hay muchos más animales infectados de lo que se pensaba y que estos responden positivamente frente a la infección.



# 1. Introducción

---

Los términos Leishmaniasis (en medicina humana) y Leishmaniosis (en medicina veterinaria), engloban todas las enfermedades causadas por protozoos del género *Leishmania*, que son transmitidos por hembras de insectos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en Europa y América respectivamente (Pearson et al, 2001).

Esta enfermedad es una zoonosis de distribución cosmopolita, y está presente en 88 países de cuatro continentes, en los cuales afecta a cerca de 15 millones de personas y que supone un riesgo de salud pública para 350 millones (Desjeux, 2004). Además presenta una incidencia de dos millones de casos nuevos al año en países tropicales (WHO 2010). Se estima que en el suroeste Europeo hay actualmente más de dos millones y medio de perros infectados y que la enfermedad se está extendiendo hacia localizaciones más frías donde antes no se presentaba (Miró et al, 2012)

Dentro de las enfermedades transmitidas por vectores es la tercera en importancia, siendo tan solo precedida por Malaria y Filariasis (Rodríguez-Cortes et al, 2010).

Existen tres formas de presentación clínica de la enfermedad, las cuales se clasifican en visceral, cutánea y mucocutánea (Pearson et al, 2001). En el área mediterránea, objeto de nuestro estudio, la enfermedad visceral está considerada la forma clínica de mayor severidad y está causada por *Leishmania infantum* (Ready, 2010).

La Leishmaniosis Canina (LC) ha adquirido una gran importancia en medicina veterinaria, debido a que los perros son el reservorio principal del parásito (Pearson et al, 2001). En Europa la gran mayoría de los perros son considerados animales de compañía, por lo que su infección por este parásito y el desarrollo de la enfermedad afecta directamente al propietario, en cuanto al coste del tratamiento y personalmente por el afecto que mantiene con su animal.

Por otro lado, no hemos de olvidar que es una zoonosis que afecta principalmente a personas inmunodeprimidas; y que existen estudios que muestran cierta asociación entre la prevalencia de animales y seres humanos infectados (Acedo et al, 1996).

Por todos estos motivos, la LC es considerada una enfermedad importante y es imprescindible realizar estudios epidemiológicos para evaluar su distribución. Así mismo es de vital importancia el desarrollo técnicas de diagnóstico precoces y eficaces, para poder establecer con buen criterio distintos tratamientos mayoría de los autores recalcan la importancia de establecer las distintas prevalencias de LC, las cuales varían en función de la zona, tipo de perro, tamaño de la muestra, límite de positividad y técnica de diagnóstico (Maia y Campino, 2008; Morales-Yuste et al, 2011).

Este último factor es el de mayor importancia, pues históricamente se han estimado prevalencias de la enfermedad a partir de técnicas serológicas (seroprevalencias), principalmente por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) y western blotting (WB) (WHO 2010); siendo la IFI la más frecuentemente utilizada, y clasificada por algunos autores como la más eficaz (Maia y Campino, 2008).

En los últimos años se ha avanzado mucho en cuanto a técnicas de diagnóstico basadas en biología molecular y la detección de DNA para el estudio de las enfermedades parasitarias entre otras (Zarlenga y Higgins, 2001). Dentro de este grupo de técnicas se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y actualmente una variedad de ésta: la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) que ha supuesto un avance incalculable debido a las ventajas que nos ofrece en comparación con el resto de técnicas y que serán detalladas más adelante en esta revisión (Francino et al, 2006). A groso modo, la qPCR nos permite cuantificar la carga parasitaria actual del animal, estimada en nuestro caso por ml de sangre.

Es muy importante diferenciar entre la infección y la enfermedad. Hasta la actualidad, la gran mayoría de los estudios epidemiológicos se han basado en pruebas de diagnóstico indirecto, las cuales subestiman la prevalencia real de infección; y es conocido que los animales sanos con carga parasitaria en sangre son igualmente fuente de infección para el flebotomo (Molina et al, 1994; Michalsky et al, 2007).

Por tanto, tal y como se detallará en el apartado correspondiente nuestro objetivo en este trabajo ha sido evaluar la prevalencia real de infectados asintomáticos en un área periurbana de una zona endémica de leishmaniosis canina, como es Zaragoza (Lucientes et al, 1991).



## 2. Revisión Bibliográfica

---

### 2.1. Leishmaniosis

#### 2.1.1. Etiología

La Leishmaniosis engloba todas las enfermedades producidas por parásitos del género *Leishmania* spp. que pertenecen al orden Kinetoplastida de la familia Trypanosomatidae. Se distinguen dos formas morfológicas: amastigotes y promastigotes, sin diferenciación sexual (Pearson et al, 2001).

El género *Leishmania* contiene 20 especies descritas, las cuales son similares morfológicamente pudiendo distinguirse por sus propiedades biológicas o bioquímicas. Mediante el análisis por medio de isoenzimas se han dividido en los siguientes grupos: *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. major*, *L. donovani*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*. Cada uno de estos grupos contiene distintas especies o subespecies y numerosas distintas cepas (Ashford et al, 2000)

En Europa y más concretamente en toda la región mediterránea, estamos afectados por *L. infantum*, la cual es la responsable de la leishmaniosis visceral y cutánea, tanto en el hombre como en el perro (reservorio principal), por lo que se considera una zoonosis de gran importancia (Ready, 2010).

En cuanto al protozoo, se ha clasificado dentro del género *Leishmania* (Ross, 1903). La posición de este género en la clasificación de Levine y cols. (1980) es la siguiente:

- Reino: Protista (Haeckel 1866)
- Subreino: Protozoa (Goldfuss 1817)
- Filum: Sarcomastigophora (Honigberg-Balamuth 1963)
- Subfilum: Mastigophora (Deising 1866)
- Clase: Zoomastigophorea (Calkins 1909)
- Orden: Kinetoplastida (Honigberg 1963)
- Suborden: Trypanosomatina (Kent 1880)
- Familia: Trypanosomatidae (Döflein 1901)
- Género: *Leishmania* (Ross 1903)

Presenta dos estadios en función del hospedador en que se encuentra:

- **Amastigote:** Es de forma ovalada y aproximadamente 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro, a veces puede presentar forma de torpedo cuando se encuentra en la piel (Figura 1). Se localizan en los fagolisosomas de células fagocíticas mononucleares (monocitos y macrófagos) de los hospedadores vertebrados (mamíferos). Poseen un núcleo alargado, que se localiza en la periferia y un kinetoplasto. En algunos se puede apreciar un flagelo rudimentario (rhizoplast). La división se realiza mediante fisión binaria.

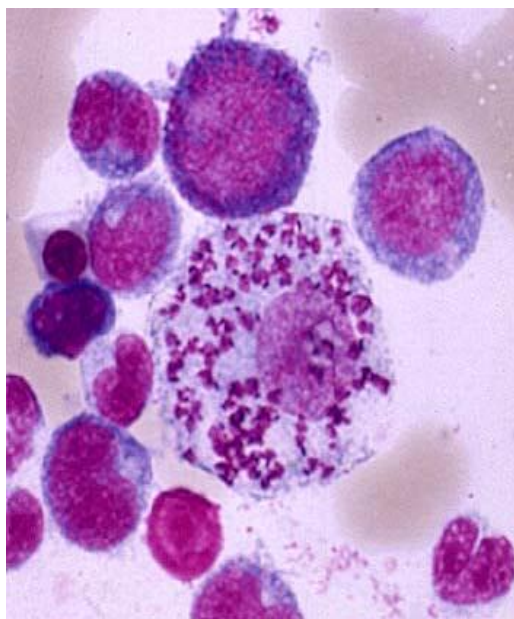


Figura 1. Amastigotes de *L. infantum* dentro de un macrófago

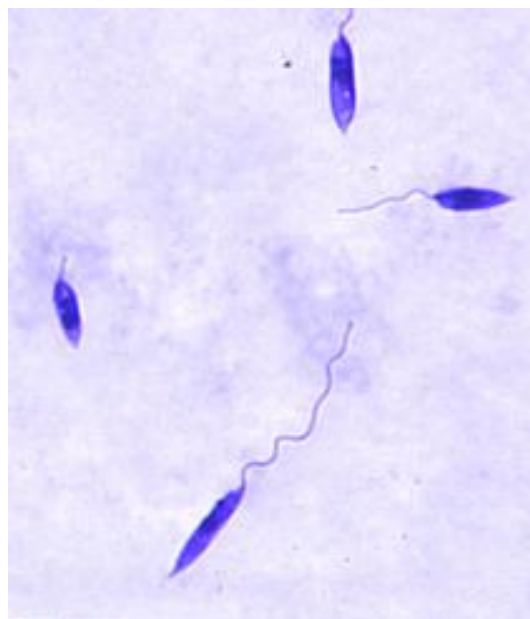


Figura 2. Promastigotes de *L. Infantum*

- **Promastigote:** Es de forma alargada mide unos 20  $\mu\text{m}$ , y presenta un flagelo libre que le permite desplazarse (Figura 2). Se localiza en el interior del hospedador invertebrado y su morfología varía en función del estado de crecimiento en el vector (Garnham, 1971).

Existen formas del promastigote que no son infectantes, pero que poseen capacidad para dividirse: procíclicos, nectomonas, leptomonas, haptomonas y paramastigotes.

El genoma de *L. infantum* es conocido, tiene un tamaño de aproximadamente de 33,6 Mb y se ordena en 36 cromosomas (Winker et al, 1996).

*Leishmania* posee dos tipos de DNA: nuclear y extranuclear en la membrana mitocondrial también conocido como DNA quinotoplástico (kDNA) (Pearson 2001). El kDNA a su vez se compone de dos tipos de anillos de DNA. Unos 25-50 maxicírculos de entre 20 y 38 kb (Pearson, 2001; Pérez et al, 2010), y miles de minicírculos de 0,5 a 2 kb, se estima que hay unos 10.000 minicírculos por célula y cada uno de estos se compone de 800 pares de bases nitrogenadas (pb) de las que aproximadamente 200 pb están en la región constante y 600 están en la región variable (Perez et al, 2010).

### 2.1.2. Ciclo biológico

Las leishmanias se transmiten principalmente mediante la picadura de un vector flebótomo (hospedador invertebrado). Los vectores capaces de transmitir *Leishmania*, se denominan “beatillas” o “moscas de la arena”, y están agrupadas dentro del orden Diptera, suborden Nematocera, familia Psychodidae y subfamilia Phlebotominae. En esta última se reconocen seis géneros, pero solo dos son importantes en cuanto a la transmisión de la enfermedad: *Phlebotomous* y *Lutzomyia* (Killick-Kendrick, 1999).

En España se han realizado estudios para determinar qué especies de flebótomos están involucradas en la transmisión del protozoo, siendo las de mayor importancia *P. papatasi* y *P. perniciosus* en zonas del interior y *P. ariasi* en áreas húmedas (Lucientes et al, 1991; Sanmartín, 1992; Galvez et al, 2010c).

La hembra de flebótomo se alimenta de sangre de mamíferos, preferentemente durante el crepúsculo. Mediante su proboscis, lacera los capilares y succiona una pequeña cantidad de sangre, la cual en caso de contener macrófagos infectados con amastigotes, infecta al flebótomo (Figura 3).



Figura 3. Hembra de *P. perniciosus*.

Estos amastigotes pasan a promastigotes en el intestino de la beatilla. Los promastigotes se multiplican y se diferencian en una serie de estadios intermedios no infectantes: promastigote procíclico, nectomona y heptomona. El siguiente estadio promastigote metacíclico, ya es infectante. Mide aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$  de largo por 1,5-3.0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se extiende el flagelo y con ayuda de éste migra hasta la proboscis del flebótomo. En condiciones ambientales normales en zonas de trópico, este proceso requiere entre 5 y 8 días (Pearson et al, 2001; Hiepe et al, 2006a).

Cuando el flebótomo ingiere sangre de nuevo, algunos de estos promastigotes metacíclicos (entre 100 y 1.000) que se distribuyen con la saliva del flebótomo, se inocularán en un nuevo hospedador vertebrado. La saliva del vector juega un papel muy importante en este proceso, pues provoca una reacción inmune local que favorece la acumulación de células hospedadoras e induce el desarrollo de una respuesta tipo Th2 dificultando la presentación de antígenos y por tanto la producción de productos oxidantes reactivos (Pearson et al, 2001; Hiepe et al, 2006a).

Una vez inoculados los promastigotes serán fagocitados por macrófagos y demás células fagocitarias (células dendríticas, células de Langerhans y neutrófilos) en cuyo interior se transforma a la forma de amastigote, donde no es detectada y puede reproducirse.

Estos amastigotes de *Leishmania* son englobados por una vacuola parasitófora que constituye un fagolisosoma, donde se multiplican hasta lisis la célula. Los amastigotes

libres circulan por el torrente sanguíneo o son fagocitados de nuevo por macrófagos o monocitos (Hiepe et al, 2006a). Así se completa el ciclo (Figura 4)

Por tanto la progresión de la infección está determinada por la eficacia de la respuesta inmunitaria celular del hospedador. De este modo el animal pasa a estar infectado y ser infectante para nuevos flebótomos. En algunos muchos casos el hospedador reacciona de modo adecuado y la infección es inaparente, mientras que en otros se desarrolla una respuesta inmune humoral exagerada, causando la enfermedad.

En cualquier caso, asintomáticos o enfermos, ambos son infectantes para el flebótomo.

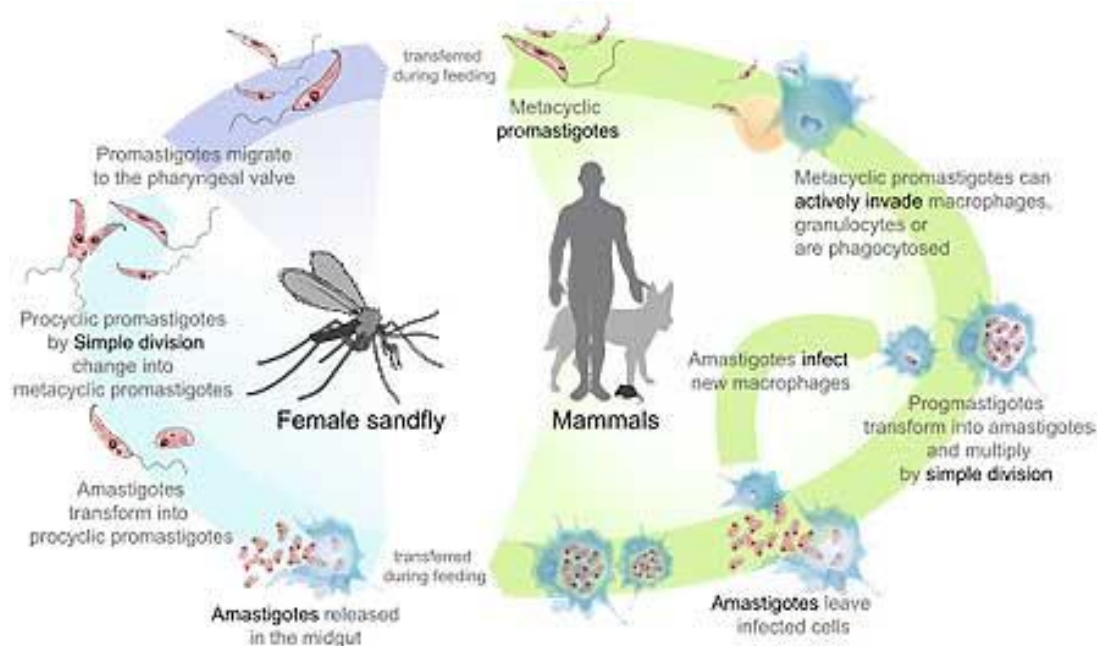


Figura 4. Esquema del ciclo de Leishmaniosis (Wikipedia: Mariana Ruiz Villarreal, 2008)

## 2.2. Cuadro clínico en perros

### 2.2.1. Mecanismos patogénicos

Una vez que el flebótomo ha infectado al hospedador con promastigotes de *Leishmania*, se produce una reacción inflamatoria local que atrae a neutrófilos, eosinófilos y células Natural Killer (NK) en primer lugar, seguidas por la aparición de macrófagos inflamatorios.

Los antígenos de *Leishmania* son fagocitados por células dendríticas en el lugar de inoculación o en su defecto se transportan por la linfa hacia linfonodos, donde estos antígenos son presentados con el fin de activar linfocitos T específicos y producir inicialmente una respuesta del tipo Th2. En función del tipo de citoquinas que se desarrollen se establecerá finalmente un tipo de respuesta con predominio Th1 o Th2.

La **respuesta Th1** se considera protectora y es la que da lugar a animales resistentes. Esta se desencadena principalmente por IL- 12 e IL- 18.

Las células dendríticas que han migrado a los linfonodos son las principales productoras de IL- 12, allí provocan la activación de células NK que liberan Interferon  $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ). Las

IL-12 estimulan la diferenciación en Th1. Estos son Th1 son activados por la producción de IFN- $\gamma$  por los macrófagos, liberan NO citotóxico, lo cual causa la muerte del parásito. Los linfocitos Th1 también promueven la proliferación de linfocitos B y la secreción de inmunoglobulinas, aunque no estimula la producción de anticuerpos específicos. Actúan en general como auxiliares de inmunorreacciones mediadas por células promoviendo la resistencia a microorganismos intracelulares.

Otro modo de destrucción de los macrófagos infectados es mediante la apoptosis de estos, la cual se produce cuando se une el ligando Fas de un linfocito T activado con un macrófago que expresa Fas.

En caso de animales sensibles en los que predomina la **respuesta Th2**, las citoquinas presentes son IL-4, TGF- $\beta$  e IL-10. Esta respuesta estimula la proliferación de linfocitos B y secreción de inmunoglobulinas. La producción inicial de IL-4 se relaciona con el antígeno LACK de *Leishmania*.

La inmunidad frente a las reinfecciones se promueve a partir de la presencia constante de bajas cargas parasitarias durante años (Hiepe et al, 2006b).

La clínica en la leishmaniosis se debe al acúmulo de anticuerpos generados cuando la respuesta inmune activa la vía Th2. Se ha comprobado que estos parásitos producen una desviación de la respuesta humoral originada por una estimulación policlonal de linfocitos B lo cual genera un exceso de inmunoglobulinas (específicas e inespecíficas). La existencia de inmunocomplejos circulantes es la causante de alteraciones en la coagulación, flujo venoso capilar y los depósitos en vasos de órganos principalmente hígado, bazo y riñón, en los cuales provocan patologías (Sanmartín, 1992).

En cuanto a la transmisión, la principal vía estudiada ha sido siempre a través del vector; pero actualmente se están estudiando vías alternativas como la vía venérea (Silva et al, 2009), transfusiones de sangre (de Freitas et al, 2006), el uso de la misma aguja en caso, esto último ha sido estudiado en personas drogadictas (Cruz et al, 2002) y excepcionalmente por mordeduras (Solano-Gallego, 2011).

### 2.2.2. Sintomatología en el perro

LC es una enfermedad sistémica que puede afectar a cualquier órgano y tejido, siendo su órgano diana la médula ósea.

Los signos generales causados por esta enfermedad son inespecíficos, pudiendo citarse entre ellos: linfadenopatía generalizada, pérdida de peso, letargia, esplenomegalia, diarreas, vómitos, fiebre, síndrome poliuria/polidipsia, etc.

Lo más frecuente es encontrar lesiones en la piel, destacando una dermatitis exfoliativa (Figura 5) no pruriginosa, con o sin zonas alopecicas sobre todo alrededor de los ojos y en la zona superior del hocico (cara de payaso) (Figura 6), úlceras principalmente en los salientes óseos (Figura 7), onicogriposis (crecimiento excesivo de las uñas), y dermatitis papulares o pustulares.



Además también se presentan signos oculares, entre los que se incluyen blefaritis, queratoconjuntivitis y uveitis.

Otros signos que pueden observarse asociados con leishmaniosis son lesiones en la mucosa, epistaxis, cojeras, miositis atrófica, desordenes vasculares y neurológicos, etc.

La presencia de uno o varios de estos signos en un animal enfermo compatible con LC nos hacen sospechar la enfermedad.



Figura 5. Dermatitis exfoliativa



Figura 6. Cara de payaso



Figura 7. Úlcera en la cara dorsal de la muñeca

Además de la evidencia clínica, la LC también altera parámetros analíticos (Figura 8). En el suero vemos hiperglobulinemia (policlonal  $\beta$  o gammaglobulinas), hipoalbuminemia y una disminución del ratio albumina/globulina. En la hematología de algunos pacientes se puede observar una anemia moderada no regenerativa, trombocitopenia y problemas en la hemostasia. El perfil bioquímico y el urianálisis muestran una proteinuria, azotemia y aumento de enzimas hepáticas (Solano-Gallego, 2012). La alteración de estos parámetros puede ser indicativa de LC.

Sin embargo a pesar de todo lo citado en muchos casos la única manifestación clínica puede ser la enfermedad renal, provocada por el depósito de inmunocomplejos en la membrana glomerular. La enfermedad renal es la principal causa de muerte de los animales con LC, ya que lamentablemente no existe una detección precoz, la disminución de la tasa de filtración glomerular y el fallo renal comienza a dar signos cuando dos tercios de las nefronas están afectadas (Cortadellas et al, 2008).

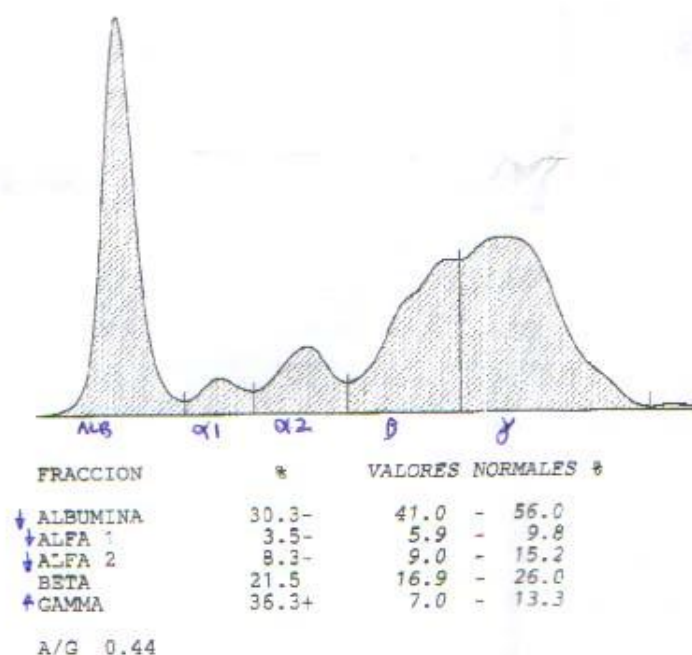


Figura 8. Proteinograma característico de LC

### 2.2.3. Tratamiento y métodos de prevención

El tratamiento y la prevención de la LC es algo que puede abordarse desde dos puntos de vista. Debido a su carácter zoonótico, los animales infectados deben tratarse para disminuir la carga parasitaria, y requieren una vigilancia y aplicación de métodos de prevención para evitar en la medida de lo posible la diseminación del parásito. En algunos países donde la Leishmaniosis causa serios problemas de Salud Pública como Brasil, las campañas de control para LC imponen medidas preventivas severas, como el sacrificio de todo animal infectado (Costa, 2011).

Por otro lado en lugares que nos afectan, cuenca del Mediterráneo (España, Italia, Francia...), donde la incidencia de la enfermedad en humanos es baja, y los perros son animales de compañía, el tratamiento de un animal enfermo se debe establecer con el objetivo de controlar la enfermedad y la clínica del paciente. Así mismo deben establecerse medidas preventivas para evitar la diseminación (Solano-Gallego et al, 2009).

#### 2.2.3.1. Tratamiento

El tratamiento clásico que generalmente resulta más efectivo consiste en la combinación del leishmanicida Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) con el leishmanioestático Alopurinol (Denerolle y Bourdoiseau, 1999; Manna et al, 2008b).

Las pautas de dosificación varían en función del paciente, pero generalmente se trata con el Antimoniato de Meglumina durante las primeras 4 semanas, para reducir la carga parasitaria, y se realiza el mantenimiento a partir del Alopurinol con tratamientos de mínimo 6 meses (Torres et al, 2011).

Los principales inconvenientes de esta terapia para el propietario, a parte del posible desarrollo de nefrotoxicidad (Beneth y Shaw, 2002), son el coste económico del

Antimoniato de Meglumina, y su dosificación a través de inyecciones subcutáneas diariamente. Por este motivo se ha invertido mucho esfuerzo en la búsqueda de tratamientos alternativos.

Hay quien rebate el uso actual de este protocolo como terapia ideal (Lamothe, 2010) basándose en la existencia de estudios que defienden el uso del Alopurinol como único tratamiento (Koutinas et al, 2001), ya que éste es menos agresivo, más económico y de administración oral.

Otro leishmanicida que actualmente se comercializa es la Miltefosina (Milteforan®) que ofrece como ventaja la eliminación por vía fecal, no renal, lo cual permite el uso de este fármaco en pacientes que ya han desarrollado cierto grado de enfermedad renal. Se han realizado estudios que demuestran su eficacia como leishmanicida (Manna et al, 2008a) y en combinación con Alopurinol para el control de la Leishmaniosis (Miró et al, 2009). El principal inconveniente de este tratamiento para el propietario es el elevado coste económico.

Otros fármacos que también han sido descritos para el tratamiento de la Leishmaniosis son la Aminosidina, Amfotericina B, Espiramicina y Marbofloxacin, combinados de diferentes formas entre sí (Solano-Gallego et al, 2009).

Actualmente se está imponiendo en el mercado el uso de terapias inmunomoduladoras, como la Domperidona (Leishguard®) que estimulan la respuesta inmune celular (Gomez-Ochoa et al, 2009).

### **2.2.3.2. Métodos de prevención**

Como ya hemos comentado, además de instaurar un tratamiento para paliar la enfermedad, es importante el uso de medidas para prevenir la picadura y así evitar la transmisión por medio del vector, ya que es la principal vía de transmisión.

Teniendo en cuenta las características ecológicas del vector (mayor actividad durante el amanecer y el anochecer, mayor presencia en zonas pantanosas, etc) podemos evitar exponer los animales a la presencia del vector, no paseando durante las horas de mayor riesgo ni por lugares infestados de flebotomos. También se aconseja el uso de insecticidas dentro de casa. Pero indudablemente la prevención mediante insecticidas tópicos de larga duración aplicados sobre el animal, es lo que nos proporciona mayor seguridad.

Uno de los métodos más utilizados es el collar con Deltametrina 4% (Scalibour®) (Figura 9), éste tiene una duración de hasta 34 semanas (Manzanillo et al, 2006) y su eficacia ha sido estudiada por diversos autores tanto en animales de compañía (Maroli et al, 2001) como en perreras (Manzanillo et al, 2006). La eficacia de estos collares como repelentes se estima bastante alta, mientras que como insecticida es escasa o nula (Halbig et al, 2000).

En el estudio realizado por Manzanillo y cols. en 2006 obtuvieron como resultado que la tasa de protección acumulada estimada teniendo en cuenta los 2 años de su estudio fue del 50,8%



El otro método son los preparados en pipetas o tipo “spot on” con Imidacloprid 10% y Permetrina 50% (Advantix®), eficaces para proteger frente artrópodos además de flebotomos (Otranto et al, 2010). La eficacia de estos productos dura aproximadamente 1 mes (Figura 10).



Figura 9. Collar de Deltametrina (Scalibour®)



Figura 10. Pipetas de Imidacloprid y Permetrina (Advantix®)

Sin embargo la eficacia de estos productos es algo que varía en función de la exposición al vector. Hay estudios citan que a partir de la 3ª semana la eficacia de repelencia se reduce al 72,8% y la 4ª semana es del 55,9% (Mencke et al, 2003). En otro estudio algo más reciente realizado por Miró y cols. (2007) estiman la eficacia como repelente sobre el 90% hasta la 3ª semana y un 74% a partir de la 4ª.

Las variaciones entre ambos estudios pueden deberse a las diferencias en el tipo de flebótomo (*P. papatasi* frente a *P. perniciosus*) y la densidad de exposición a éste (200 insectos por perro en el estudio de Menke y cols. frente a 100 en el de Miró y cols.). En cualquier caso se debería repetir la dosificación cada 3 semanas para ser eficiente frente al flebotomo.

Un estudio realizado por Ferroglio y cols. (2008) comparó la eficacia de las Deltametrinas contra concentraciones algo superiores de Permetrina, llegando a la conclusión de que la protección ofrecida por ambas es equivalente.

Recientemente se han incorporado al mercado dos tratamientos nuevos como profilaxis. La Domperidona (Leishguard®), que ya ha sido citada en el apartado anterior, se ha comercializado como jarabe tanto para prevención como para tratamiento (Gomez et al, 2004 y 2009) (Figura 11), y también se ha comercializado una vacuna inyectable contra la leishmaniosis (Canileish®) que se basa en la fracción proteica de la proteína secretada-excretada por el parásito (Figura 12).



Figura 11. Domperidona (Leishguard®)



Figura 12. Vacuna CaniLeish®

## 2.3. Técnicas de diagnóstico

### 2.3.1. Diagnóstico de Leishmaniosis

A nuestro parecer, hay distintos motivos por los que se debe diagnosticar la LC en perros que vivan en zonas expuestas al vector.

En primer lugar para poder confirmar la enfermedad en caso de que el animal esté siendo afectado, y poder instaurar un tratamiento del modo más precoz posible, con objeto de evitar que se agrave.

En segundo lugar, se debe realizar un chequeo anual en animales aparentemente sanos, que viven en zonas endémicas, posterior a la época de actividad del vector, con el mismo objetivo que en el caso anterior.

En tercer lugar, a raíz del segundo caso, se debe realizar un chequeo en caso de que el animal vaya a viajar de una zona endémica a una libre.

En cuarto lugar, es importante realizar este chequeo si el animal va a donar sangre, ya que es una posible vía de transmisión.

Y por último, en quinto lugar, para la realización de estudios epidemiológicos, que pretenden establecer las prevalencias en distintas localizaciones y estudiar el modo de expansión de la infección.

### 2.3.2. Técnicas Indirectas

Estas técnicas evalúan la respuesta inmune humoral frente a la infección, basándose en la detección de anticuerpos específicos frente al parásito en el suero del paciente. Este tipo de técnicas son las más frecuentemente utilizadas.

La producción de anticuerpos es baja durante las primeras y últimas etapas de la infección, y en animales asintomáticos, sin embargo los animales infectados van a desarrollar anticuerpos de modo gradual (Oliva et al, 2006).

Aunque este tipo de pruebas se correlaciona bastante bien con el desarrollo de la enfermedad, muestran ciertos inconvenientes en cuanto a su uso para el diagnóstico, ya que pueden producirse reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otros patógenos comunes, como la *Ehrlichia canis*, y la persistencia de los anticuerpos después de la recuperación (Ferreira et al, 2007). Cabe comentar que las coinfecciones por *E. canis* y otros patógenos tales como *Babesia* son frecuentes en animales con LC (Tabar et al, 2009).

- **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):** Considerada por algunos autores como la prueba de oro (*Gold Standard*) dentro de las pruebas de diagnóstico serológico (Maia y Campino, 2008).

Esta prueba se basa en la detección de anticuerpos en el suero, los cuales se unen a antígenos preparados en el laboratorio, y en este caso se puede utilizar el cuerpo entero del parásito como antígeno (tanto amastigotes como promastigotes) para aumentar la reproducibilidad.

Una vez realizada la unión se lava, dejando solo los anticuerpos específicos unidos, y se incuba de nuevo con una solución que contenga una antiglobulina marcada por un fluoróforo (generalmente fluoresceína), y de nuevo se realiza un lavado. Se consideran positivas aquellas muestras en las que se observa fluorescencia verde homogénea al microscopio, mientras que las que se ven de color rojo se clasifican como negativas (Figuras 13 y 14).

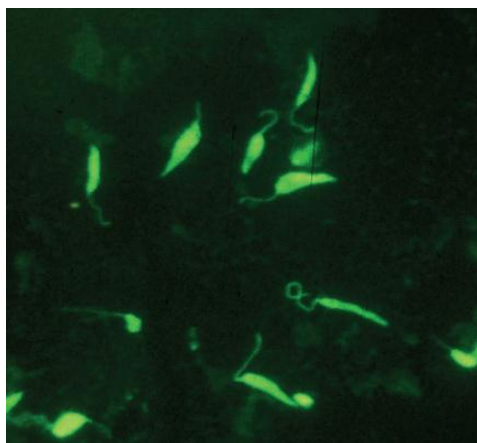


Figura 13. Diagnóstico positivo mediante IFI para *L. infantum*

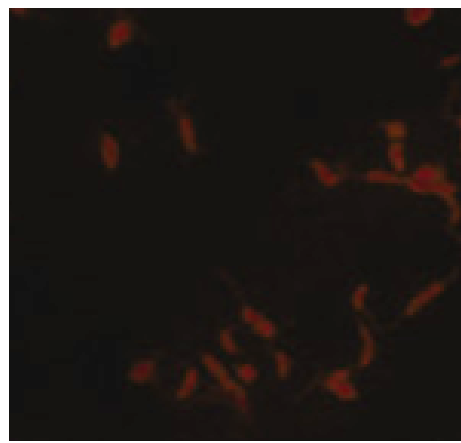


Figura 14. Diagnóstico negativo mediante IFI para *L. Infantum*

Su realización requiere destreza y experiencia y unas instalaciones adecuadas. Otro de sus inconvenientes es que para estimar la cantidad de anticuerpos en el suero problema, hay que realizar diluciones seriadas de los sueros, por lo que se considera una técnica laboriosa.

La ventaja frente a la inmunofluorescencia directa (IFD) es que cada anticuerpo unido al antígeno se unirá a varias antiglobulinas marcadas, lo cual aumenta la sensibilidad. El uso de antiglobulinas específicas para cada clase de inmunoglobulina aumenta la especificidad (Tizard, 2000).

En un estudio realizado por Maia y cols. (2009) se estudiaron perros sintomáticos y asintomáticos de un área endémica, la sensibilidad y la especificidad de la técnica fueron 87,5% y 94,7%, respectivamente. Esta técnica se ha comparado con tantas otras para evaluar su sensibilidad respecto a ellas, siendo menor en comparación con WB (Fernández-Pérez et al, 2003).

Hoy en día existen algunos kits comerciales para IFI, pero los antígenos preparados en laboratorio suelen ser mucho más eficaces.

- **Ensayo Inmunoenzimático (ELISA):** Al igual que la IFI esta técnica es ampliamente utilizada para el diagnóstico de LC, ambas son las pruebas serológicas recomendadas por la OMS (WHO, 2010).

Esta prueba puede utilizarse para detectar y cuantificar tanto anticuerpos (ej: ELISA en microfasetas) como antígenos (ej: ELISA Sandwich) que se considera una prueba de detección directa.

Se expone el suero problema sobre placas cubiertas de antígenos pegados a éstas, se incuban y lavan dejando solo los anticuerpos unidos los cuales se detectan mediante la unión de una antiglobulina que tiene una enzima ligada. Al añadir el sustrato para esta enzima, en caso de existir los anticuerpos se habrán unido las antiglobulinas con la enzima y esta reaccionará proporcionando un producto colorado, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpos presente en el suero. Se puede estimar a ojo o mediante un espectofotómetro (Tizard, 2000).

Existen en el mercado test rápidos como el Snap 1 LCATK, con elevada especificidad, sensibilidad y fiabilidad comparados con IFI y WB, que además se puede realizar con sangre entera (Ferroglia et al, 2007).

- **Western Blotting (WB):** Esta prueba se basa en tres etapas: 1º) una electroforesis de una mezcla de proteínas en geles para que cada componente se resuelva en una banda; 2º) la transferencia de esta proteína a un papel de inmovilización a través de la colocación de una membrana de nitrocelulosa y esto sumergido en un amortiguador al que se transfiere una corriente, y 3º) se visualizan los antígenos transferidos mediante inmunoanálisis enzimático.

Su realización es compleja y cara por lo que generalmente solo se utiliza en investigación (Ferroglia et al, 2007).

Además se han realizado estudios mediante esta técnica que permiten constatar la existencia de una cierta polaridad en la respuesta inmune de los animales, la cual difiere entre animales sintomáticos o asintomáticos, tratados o no (Fernández-Pérez et al, 2003).

- **Contrainmunolectroforesis (CIE):** Esta técnica para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* se basa en la visualización de un precipitado azul (tinción Azul de Coomassie) en un gel debido a la interacción entre los antígenos de *Leishmania* y los anticuerpos presentes en las muestras de suero sometidas a electroforesis.

En estudios recientes se estimó una sensibilidad de 85,5% y una especificidad de 94,7% (Maia et al, 2007).

- **Test de Inmunodifusión (ID):** consiste en una inmunodifusión doble en un gel de agarosa al 1% con un 3% de PEG, y se realiza con muestras de suero y antígeno soluble de *Leishmania* (LSA). Aparecen unas bandas en el gel después de una tinción de 24 h con Azul de Coomassie.
- **Test de Aglutinación Directa (DAT):** Emplea promastigotes enteros teñidos en forma de suspensión o congelados en polvo (*freeze-dried*). Es barata y sencilla, y puede utilizar plasma o suero. Los inconvenientes son el largo periodo de incubación (18 h) y la necesidad de hacer diluciones seriadas.

Existen algunas variantes de este test, como el test de aglutinación rápida (FAST) (Schoone et al, 2001) o el Easy DAT diseñado por Gómez-Ochoa y cols. (2003).

- **Tests Rápidos Inmunocromatográficos:** Estas pruebas ofrecen como principal ventaja que pueden ser usados directamente por el veterinario, pero el gran inconveniente es la menor fiabilidad que ofrecen, con especificidades entre el 61-75% (Reithinger et al, 2002).

Presenta dos líneas (una de control y una de test), que proporcionan un diagnóstico cualitativo (positivo/negativo). Los componentes del kit deben ser almacenados conforme lo indicado ya que si no pueden provocar resultados falsos (Maia y Campino, 2008).

- **Citometría de Flujo (CF):** Esta técnica de anticuerpos fluorescentes se utiliza para identificar antígenos superficiales. Consiste en marcar una suspensión celular con un anticuerpo monoclonal fluorescente contra un antígeno específico de superficie celular. Luego se determinan las características de las células marcadas y las que no lo están. Es una técnica cuantitativa que permite analizar mezclas de células e identificar sus fenotipos (Tizard, 2000).

Además dentro de las técnicas de diagnóstico indirecto, existen algunas pruebas diseñadas para evaluar la respuesta celular. Son menos utilizados y los citaremos muy brevemente:

- **Intradermoreacción o Test de Montenegro:** Consiste en observar y medir la reacción de induración cutánea que se produce a las 48-72 h siguientes a la administración de una suspensión de promastigotes fenolizados intradérmicamente. Simplemente se dibuja sobre la piel el diámetro la reacción y se mide, si es mayor a 5 cm se considera indicativo de que existe respuesta de inmunidad celular (WHO, 2010).
- **Ensayo de Linfoproliferación (LPA):** Este método mide la capacidad de los linfocitos de un cultivo de tejido de sufrir una proliferación clonal cuando son estimulados in vitro por una molécula externa, un antígeno o un mitógeno; en este caso por Antígeno Soluble de *Leishmania* (LSA).
- **Ensayo de Inhibición (IFNB) y Efecto Citopático de IFN- $\delta$ :** Con este ensayo se detecta el IFN- $\delta$  producido por los linfocitos circulantes en sobrenadantes de cultivo (Maia y Campino, 2008).

### 2.3.3. Técnicas Directas

#### 2.3.3.1. Generalidades

Se basan en la demostración de la presencia del parásito en los frotis o en el estudio histopatológico de biopsias, el cultivo o la detección del DNA de la *Leishmania* con la PCR. Generalmente solo se utilizan en investigación, y entre ellas también se incluyen la inoculación a animales y el xenodiagnóstico (Maia y Campino, 2008).

- **Examen microscópico:** Se basa en la observación directa al microscopio de los amastigotes de *Leishmania* en frotis teñidos de órganos y tejidos infectados, como médula ósea, linfonodo, piel o sangre periférica. Mediante la tinción de Giemsa o de

Leishman es posible observar los amastigotes con un diámetro de 2-4  $\mu$ m; el citoplasma se ve azul claro con un núcleo que se tiñe de rojo.

- **Histopatología:** Se realiza sobre órganos infectados teñidos con Hematoxilina-Eosina (HE) y requiere bastante tiempo para poder identificar los amastigotes mediante esta técnica.
- **Inmunohistoquímica (IHQ):** Es una herramienta complementaria para confirmar el diagnóstico. La identificación histopatológica e inmunohistoquímica de los amastigotes requiere experiencia y formación y pueden mostrar resultados falsos negativos.
- **Cultivo:** Requiere utilizar distintos medios de cultivo en función de la cepa de *Leishmania*; y no todos los órganos del mismo animal tendrán la misma carga parasitaria.
- **Aislamiento del parásito en animales de laboratorio:** Se basa en la inoculación en animales de experimentaciones receptivos, fundamentalmente roedores.
- **Xenodiagnóstico:** Se emplea para la detección y aislamiento del parásito a partir de su vector artrópodo.
- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Representa a las pruebas de diagnóstico molecular, son las de mayor fiabilidad en cuanto a la detección directa del parásito. Amplifican una secuencia del DNA del parásito, por lo que son capaces de detectar cantidades muy pequeñas lo que le confiere una gran sensibilidad de un modo muy específico. Son útiles tanto para el diagnóstico como para seguir la evolución del tratamiento. Permiten cuantificar la carga parasitaria en función de la unidad de muestra. Las muestras empleadas son: sangre, medula ósea, aspirado de linfonodos, biopsias de piel, hisopos conjuntivales o biopsias de otros órganos. Existen distintos tipos de PCR, PCR convencional, Nested-PCR (n-PCR), PCR cuantitativa o en tiempo real (qPCR), Retrotranscriptasa PCR (RT-PCR) y Multiplex PCR.

Las ventajas que presenta la qPCR con respecto a la PCR estándar son que es mucho más rápida, se reduce el riesgo de contaminación y tiene mayor sensibilidad.

### 2.3.3.2. PCR en Tiempo Real (qPCR)

No hay duda de que la PCR a tiempo real ha supuesto un gran avance dentro de este campo en comparación con el resto de modalidades de la PCR, ya que nos permite establecer una cuantificación de la carga patógena, por unidades de tejido. En nuestro caso número de parásitos por ml de sangre (Lodish et al, 2005).

Esto ofrece la ventaja, no solo de poder establecer categorías en función de la carga parasitaria, sino que también nos permite monitorizar la evolución de la enfermedad. Además la detección directa del parásito evita dudas o resultados ambiguos asociados con métodos de diagnóstico indirectos (Zarlenga y Higgins, 2001).

Los inconvenientes generales de cualquier PCR son la posibilidad de contaminación, lo cual conlleva la aparición de falsos positivos; y la existencia de sustancias que inhiban la actividad enzimática tanto en sangre como en otros tejidos corporales (Zarlenga y Higgins, 2001).

Como ya se ha comentado en el apartado previo, la PCR se basa en la amplificación de una secuencia concreta del DNA del parásito. Conocida la secuencia de nucleótidos, se elige una secuencia que sea específica del patógeno que queremos identificar y se diseñan los “*primers*” o cebadores (secuencias de nucleótidos complementarias, que se unen en ambos extremos 3’ y 5’) complementarios (Vandesompele, 2008).

Una vez extraído el DNA de la muestra elegida (sangre, aspirado medular o ganglionar, hisopos conjuntivales, biopsias de piel...) se mezcla con los cebadores seleccionados y el resto de los componentes que pueden prepararse en el laboratorio o adquirir una mezcla comercial “Master Mix” que los lleva ya en una mezclados del modo óptimo.

- **Componentes:**

- **Taq Polimerasa:** Esta enzima sintetiza la hebra complementaria de DNA una vez que los cebadores se han unido a las hebras de DNA desnaturalizado.

Un grupo de Taq polimerasas es la Hot Start Taq Pol, que es inactiva a temperaturas bajas y se activa al calentarse a 95°C entre 5 y 10 min. Existen dos tipos:

- Antibody-blocked Taq Pol: Está unida a un inhibidor termolábil.
- Chemically-Blocked Taq Pol: Es inactiva a 60°C (temperatura de hibridación de los cebadores) lo cual previene la formación de dímeros del cebador.

- **Bases nitrogenadas:** dNTPs/dUTPs o solo dNTPs.

- **Sondas (Taq Man):** Son secuencias con los extremos 3’ y 5’ covalentemente modificados con tintes distintos; un *reporter* (fluoróforo) y un *quencher* (6-carboxy-tetramethyl- rhodamine) respectivamente.

- **Tintes:** Existen varias opciones:

- *SYBR Green*: Es el más usado, se intercala en las cadenas de DNA y apenas emite fluorescencia mientras estas están separadas, sin embargo al hibridarse aumenta siendo proporcional a la cantidad de producto sintetizado. Emite fluorescencia a 520 nm. Se une de modo inespecífico a cualquier tipo de DNA, por lo tanto para saber si nuestra qPCR ha amplificado el segmento adecuado se debe observar la curva de disociación.
- *Bromuro de Etidio*: Es cancerígeno por lo que se ha disminuido su uso.

- **Opcionales:**

- *ROX*: Un tinte que requieren algunos termocicladores para normalizar
- *Fluoresceína*
- *MgCl<sub>2</sub>*: Necesaria en la RT-PCR
- *Uracil-N-Glicosilasa*: Enzima que hidroliza las cadenas simples y dobles con dUTPs
- *Tinte inerte*: En algunos buffers para visualizarlos

- **Termociclador:**

Una vez elaborada la muestra se introduce en un termociclador, este aparato realiza los ciclos de temperaturas entre 4 y 96°C necesarios para que se realice la PCR. En cada ciclo de temperatura se duplica la cantidad de DNA presente.

A su vez recoge la fluorescencia emitida mediante fotos que se realizan en función del programa preparado. Está asociado a un ordenador donde se generan las curvas de resultados mientras se desarrollan los ciclos (a tiempo real) lo que nos permite ir viendo la evolución de la reacción.

- **Curvas:**

- **Curva de amplificación (Amplification Curve or Primary Grow Curve):** Enfrenta la fluorescencia (eje OY) frente los ciclos (eje OX) y sirve para diagnosticar si una muestra es positiva o no.

Típicamente vemos tres fases (Figura 15): fase inicial (las cantidades de ADN son indetectables), fase logarítmica-lineal (la cantidad de ADN crece linealmente) y la fase de meseta o de “plateau” (el sistema de detección se satura o alguno de los componentes de la reacción se han agotado).

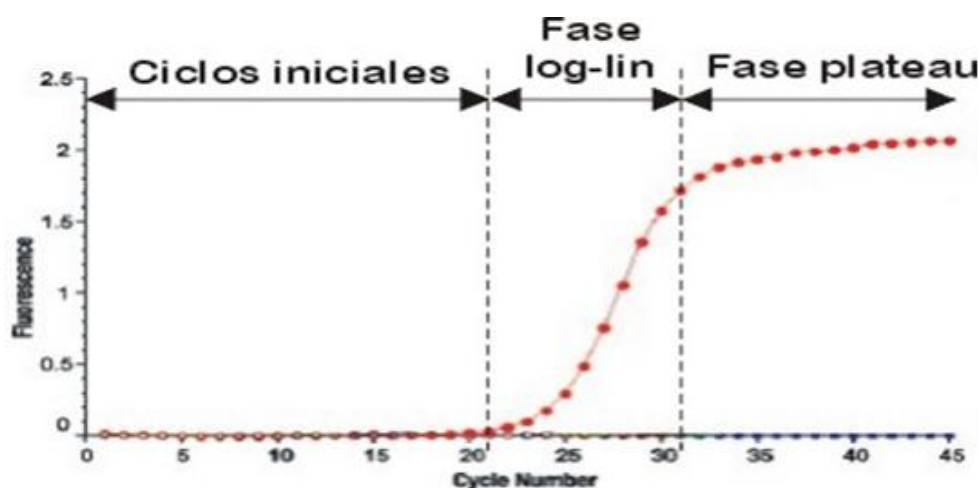


Figura 15. Fases de la qPCR

En esta curva hay que determinar la línea de base, el ciclo umbral (*CT threshold*) y el valor de la CT (*CT value*).

- El *ciclo umbral* se define como el número de ciclos necesarios para que se produzca un incremento significativo de la fluorescencia respecto a la señal de base y es inversamente proporcional a la cantidad de moléculas de molde. El sistema empieza a detectar la señal asociada al incremento exponencial del producto PCR (fase exponencial).
- *Valor de la CT*: Este último numera el ciclo en el que se detecta un incremento en la señal que cruza el ciclo umbral. Si esta CT es baja significa que hay mucha cantidad de DNA inicial y viceversa.



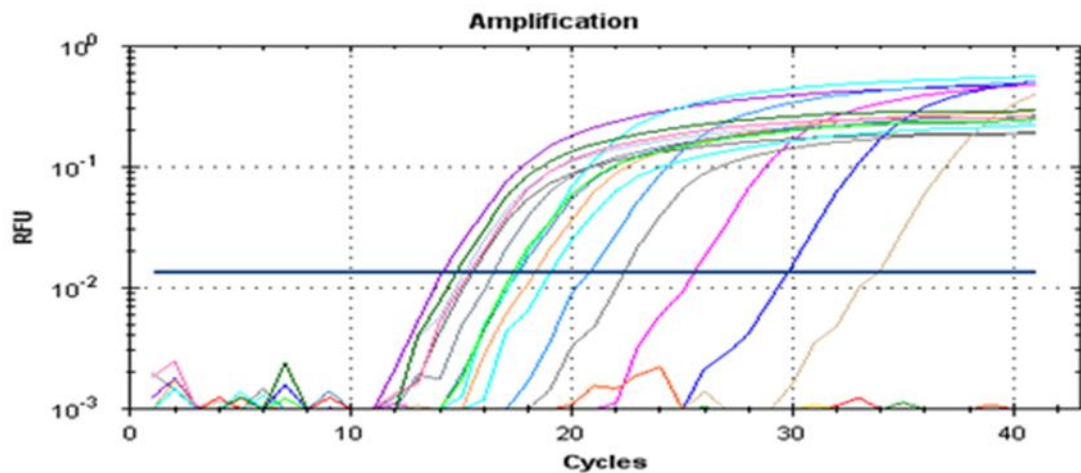


Figura 16. Relación entre la escala logarítmica y los ciclos de replicación

- **Curva de fusión (Melting curve):** Enfrenta la fluorescencia (eje OY) frente la temperatura (eje OX) se obtiene tras la amplificación por el decaimiento de la señal fluorescente, debido a la fusión del producto dependiente de la temperatura. Cada producto tiene una temperatura de disociación específica en función del tamaño y tipo de bases que contiene, y esto nos permite saber si el producto que se había formado era específico o no. La derivada de la curva de fusión revela un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto ( $T_m$ ). El área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto.

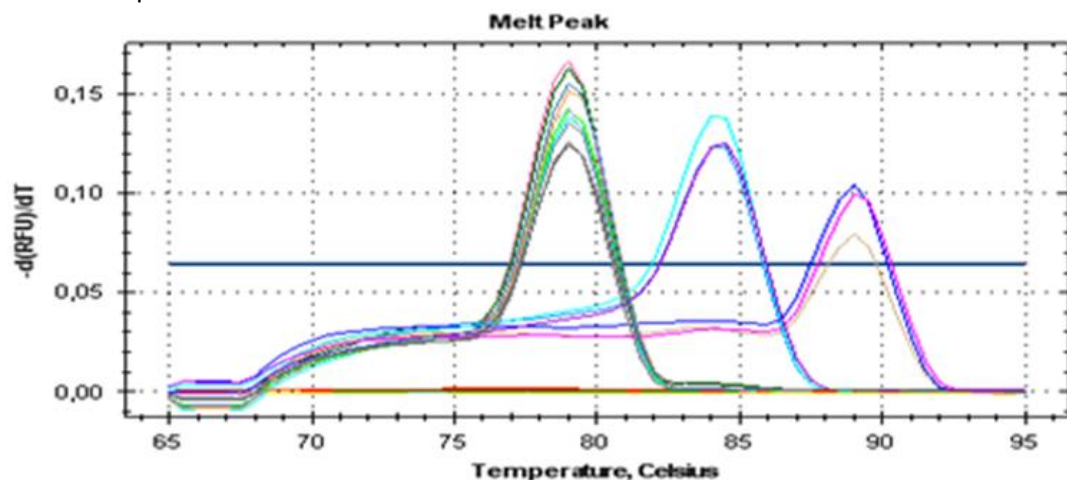


Figura 17. Presentación de distintas curvas de fusión

- **Curva de estandarización o calibrado:** Esta es diferente de las dos anteriores, y es la curva que debe realizarse para la puesta a punto de la prueba. Esta es una línea de ajuste que se elabora mediante diluciones seriadas de una concentración inicial conocida, para posteriormente poder cuantificar la carga de modo absoluto. Si no se realiza, el resultado se expone sin unidades y la cuantificación es relativa. La pendiente de esta curva nos informa de la eficiencia de la reacción. Si la pendiente es de -3.32 significa que la PCR es 100% eficiente.

El número de copias se determina por comparación al ajuste lineal entre el número de ciclos y el inverso del logaritmo de las copias en la muestra.

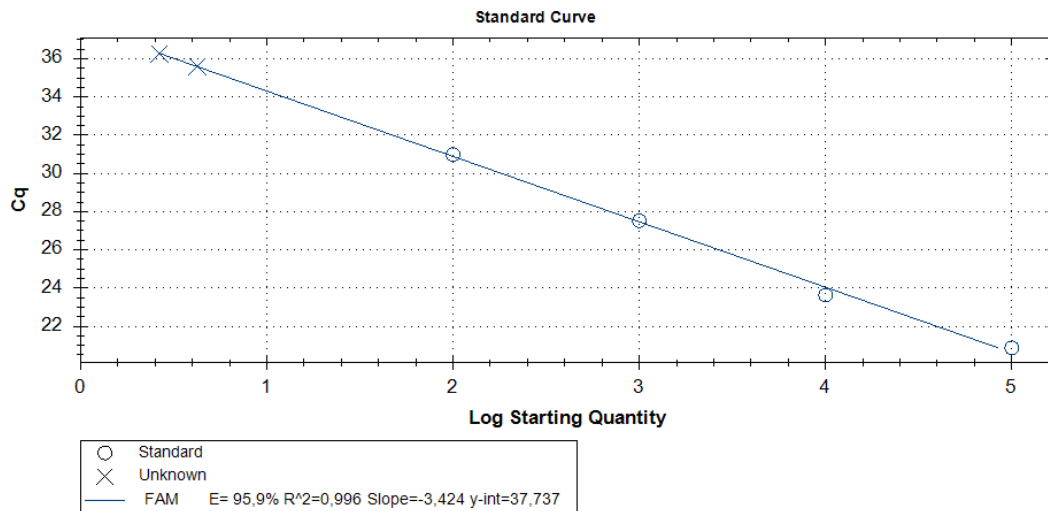


Figura 18. Curva patrón

### 2.3.3.3. Ventajas de la qPCR frente a la IFI

La qPCR es una herramienta que además de poder utilizarse para el diagnóstico precoz de LC en animales que aun no han seroconvertido. Se emplea como prueba de confirmación en animales dudosos, para poder descartar una posible reacción cruzada. Posee mayor especificidad y sensibilidad que IFI.

La otra gran ventaja atribuible a qPCR es que permite monitorizar la respuesta al tratamiento en tiempo real, mientras que los anticuerpos pueden permanecer en sangre durante meses, de forma que el efecto de los leishmanicidas puede valorarse de inmediato mediante esta prueba.

En el estudio realizado por Martínez y cols. (2011) concluyen que aquellos perros con un rango de parasitemia de medio a alto o muy alto enfermarán de LC.

Cuando se pretende estimar la prevalencia de infectados, como es el objeto de este estudio, para evaluar la distribución de estos animales; las pruebas serológicas como la IFI no son suficientemente "buenas" por los siguientes motivos:

- La seroconversión se produce entre los 3-6 meses posteriores a su infección en función del sistema inmunitario del animal. Lo cual puede infravalorar la prevalencia de afectados, ya que en el momento de la recogida de muestra de los animales es posible que algunos de ellos aún no hayan desarrollado anticuerpos.
- Algunos animales responden adecuadamente a la infección, produciendo una respuesta celular efectiva y no humoral, por lo que no serán detectados.
- Por el contrario en caso de reacciones cruzadas o falsos positivos, frecuentes en esta técnica, puede sobrestimarse la prevalencia.

Por todas estas razones, es de incuestionable importancia utilizar otro tipo de técnicas de diagnóstico directo como es la qPCR, para el estudio de la prevalencia de infectados de una

región o zona, que nos permita conocer con exactitud la cantidad de animales que tienen el parásito circulante en sangre y que por ello pueden ser una fuente de infección para los mosquitos que se alimenten en ellos; posibilitando así la transmisión del parásito.

Ya hemos citado que la qPCR será la técnica utilizada en nuestro estudio, ya que se trata de la prueba diagnóstica más actual y fiable, permitiendo establecer una prevalencia real de infectados, la cual varía significativamente en comparación con las prevalencias estimadas mediante IFI.

## **2.4. Estudios sobre la prevalencia de Leishmaniosis**

Desde mediados de los 80 hasta la actualidad distintos grupos de investigación han realizado estudios para establecer las prevalencias de las distintas zonas. Hasta la fecha prácticamente la totalidad de los estudios poblacionales realizados se basan en pruebas serológicas lo cual ha subestimado la prevalencia de infectados. No hay que olvidar que la presencia de anticuerpos significa que ha habido una exposición al parásito pero no implica su presencia (Morales-Yuste et al 2012).

Es importante elegir la prueba diagnóstica en función con el tipo de estudio que se pretenda realizar. Las pruebas de diagnóstico directo, que identifican los animales infectados son las más adecuadas para establecer las prevalencias de infección ya que los perros asintomáticos que no han desarrollado anticuerpos son igualmente infectantes para los vectores.

La prevalencia de infectados se define como la proporción de casos en un momento dado.

$$\text{Prevalencia Puntual} = \text{Nº total de casos (nuevos + viejos)} / \text{Población total}$$

La elección del método de diagnóstico, el momento, la localización y las características de población estudiada influyen significativamente en el resultado de la prevalencia estimada (Morales-Yuste et al, 2012). Todo esto debe de tenerse en cuenta cuando se pretende comparar distintos estudios pues generalmente no están en condiciones equiparables.

Entre los estudios más recientes publicados en España sobre la prevalencia de Leishmaniosis destacamos los siguientes trabajos.

Solano-Gallego y cols. (2001) realizaron un estudio en Mallorca en el cual 100 perros fueron diagnosticados mediante ELISA y PCR en diferentes tejidos (médula ósea, conjuntiva y piel). En la muestra seleccionada 13 animales mostraban sintomatología y 87 eran asintomáticos. Considerando como positivos los animales con resultado positivo por alguno de estos test, se estimó una prevalencia global del 67%.

Otro estudio reciente realizado en Madrid por Gálvez y cols. (2010) sobre 1076 perros, estimó por medio de IFI una prevalencia de 8,1% entre los años 2006-2007. Los autores citan que, en referencia a estudios de 1992, la prevalencia detectada fue 1,54 veces mayor.

En cuanto a nuestro área de estudio, Zaragoza, podemos encontrar datos muy interesantes en la Tesis Doctoral de Ana Peris (2010), ya que en esta se realizó un estudio longitudinal durante 2 años que estableció una seroprevalencia final de 11,9% en la ciudad de Zaragoza y de 8,5% en Aragón.

En referencia a estudios de prevalencia que incluyen datos estimados mediante PCR, algunos autores ya han utilizado esta prueba comparándola con pruebas serológicas.

Un estudio interesante al respecto es el realizado por Morales-Yuste y cols. (2012), en cual evaluaron las implicaciones del uso de distintos métodos, concretamente IFI, ELISA y PCR; en animales agrupados en tres grupos: animales encuestados al azar, sintomáticos y un grupo control negativo proveniente de una zona libre de LC (Estrasburgo) que lógicamente resultaron negativos a todo, con la excepción de un título IFI 1/80 atribuible a una reacción cruzada. Los dos primeros grupos se seleccionaron en un área endémica (sureste de España). Utilizando el dintel 1/80, la prevalencia dentro del grupo de animales asintomáticos fue del 30% mientras que estimada por PCR en sangre fue del 49,9%. Además este grupo se subdividió en animales procedentes de zonas termomediterráneas y mesomediterráneas, observándose en esta segunda localización prevalencias superiores tanto por PCR como por IFI.

El estudio realizado en Mallorca por Fernández-Bellón y cols. (2008), con objeto de evidenciar la variación de la seroprevalencia en función del momento en que se tome la muestra, antes o después del periodo de actividad del vector. Se encuestó un total de 79 animales que iban de la protectora municipal, previamente a su eutanasia. Las prevalencias estimadas por medio de pruebas moleculares (PCR a partir de muestras cutáneas) fueron significativamente mayores que las estimadas mediante IFI 24% frente el 8% en el primer periodo (Febrero). Otra conclusión que se obtuvo de este estudio fue que a diferencia de las prevalencias estimadas por PCR las prevalencias estimadas mediante IFI variaron de un 8% en Febrero a un 20% en Octubre. Este hecho nos recalca la importancia de tener en cuenta los periodos en que se han encuestado los animales cuando queremos realizar o comparar estudios sobre las seroprevalencias.

Un trabajo que también resulta interesante a revisar para nuestro estudio, es el realizado por Martínez y cols. (2011) en la Universidad Autónoma de Barcelona sobre 710 perros. El interés de este estudio es que utilizan las técnicas de ELISA y qPCR. La infección se detectó en el 36,3% mientras que solo el 17,9% se clasificaron como enfermos de LC. De los animales, el 4,5% fueron positivos por qPCR, el 16,2% se detectaron por ELISA y un 15,6% fueron positivos a ambos test.

También nos ha resultado interesante el trabajo realizado por Tabar y cols. (2009), los cuales encuestaron 159 animales que acudieron a la consulta del hospital de la facultad de veterinaria de Barcelona, mediante el uso de PCR en sangre periférica. Concluyendo que un 29,4% de los animales estaban infectados por *L. infantum* y que esto se asociaba de modo significativo con la presencia de coinfecciones. No podemos considerar estos datos para calcular la prevalencia ya que se incluyeron animales que provenían de zonas muy dispares.

En cuanto a la qPCR, hemos encontrado un estudio prospectivo realizado en Francia por Aoun y cols. (2009). Se incluyeron aproximadamente 140 perros militares entre los años 1986 y 2006. Se comparó la técnica qPCR realizada con una sonda TaqMan contra las técnicas serológicas WB, obteniendo una prevalencia global del 50% y una concordancia entre las pruebas del 55%.

## 3. Objetivos

---

### 3.1. Objetivo principal

El objetivo principal de este Proyecto de Fin de Máster es establecer las prevalencias actuales de infectados por *Leishmania infantum* mediante dos técnicas diferentes, IFI y qPCR en animales asintomáticos del área periurbana de una población endémica (Zaragoza).

### 3.2. Objetivo secundario

El objetivo secundario de este estudio fue evaluar la influencia como factores de riesgo de las distintas variables encuestadas.



## 4. Material y Métodos

### 4.1. Descripción del estudio

#### 4.1.1. Área de estudio

El estudio se ha llevado a cabo a partir de perros de los clientes habituales de una clínica veterinaria situada en el municipio de Zaragoza, restringiendo el área de estudio a la zona circundante al barrio de Miralbueno (donde se localiza la clínica), que corresponde a un área periurbana en la que los animales tienen acceso a zonas con las mismas condiciones ambientales y urbanísticas, evitando que esto actúe como un factor de confusión que pueda influir en el resultado de nuestro estudio. Es importante tener en cuenta este factor cuando se realizan estudios epidemiológicos sobre localizaciones de gran extensión, ya que si no se delimita correctamente las zonas a estudiar podemos encontrarnos diferencias debidas a variaciones en la probabilidad de presentarse el vector. Por ejemplo, los animales que residen en zonas totalmente urbanizadas generalmente pasean por pequeños jardines acondicionados, y la presencia del vector en estos lugares de escasa vegetación y humedad, es significativamente menor que en los barrios del extrarradio o zonas cercanas a la rivera donde las condiciones favorecen la actividad del vector, pudiendo esto afectar a la prevalencia como se ha visto en otros estudios (Galvez et al, 2010a).

Las zonas incluidas en el área de estudio se delimitaron utilizando como criterio el código postal al que pertenecen. Así pues, se realizó una primera selección según la procedencia de los animales, permitiendo solo participar a los que procedían de las distintas zonas incluidas en el estudio y que se correspondían fundamentalmente a los distritos 50011 y 50012 de Zaragoza (Figura 19).

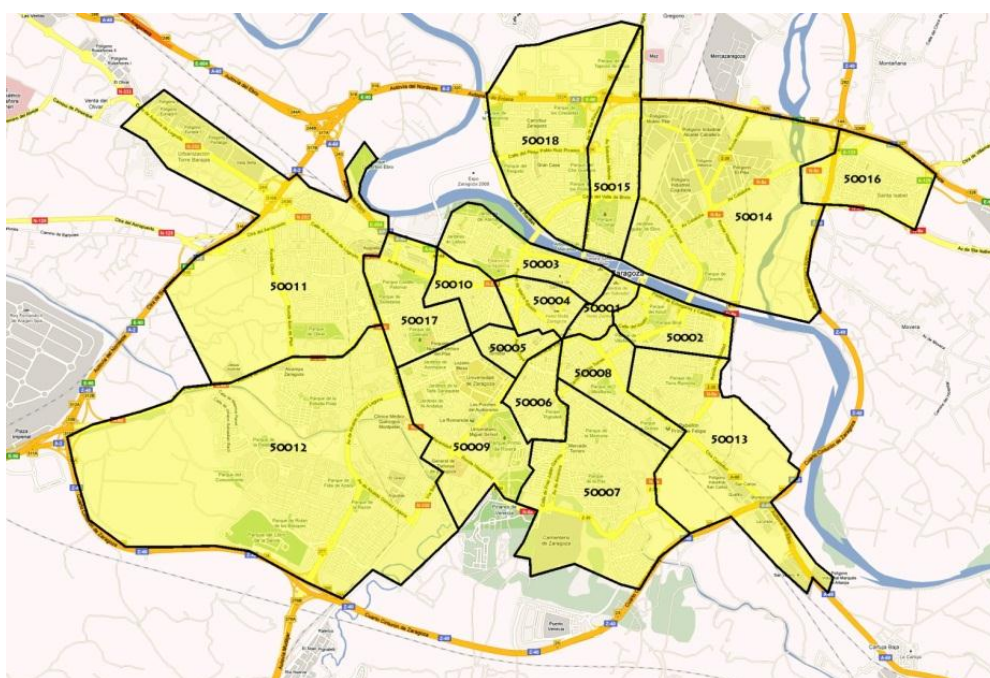


Figura 19. Distritos de la ciudad de Zaragoza



La Figura 19 muestra la distribución de las distintas zonas seleccionadas (Garrapinillos, Autovía de Logroño, Miralbueno-Oliver, Valdefierro, Bombarda-Hispanidad y Montecanal).

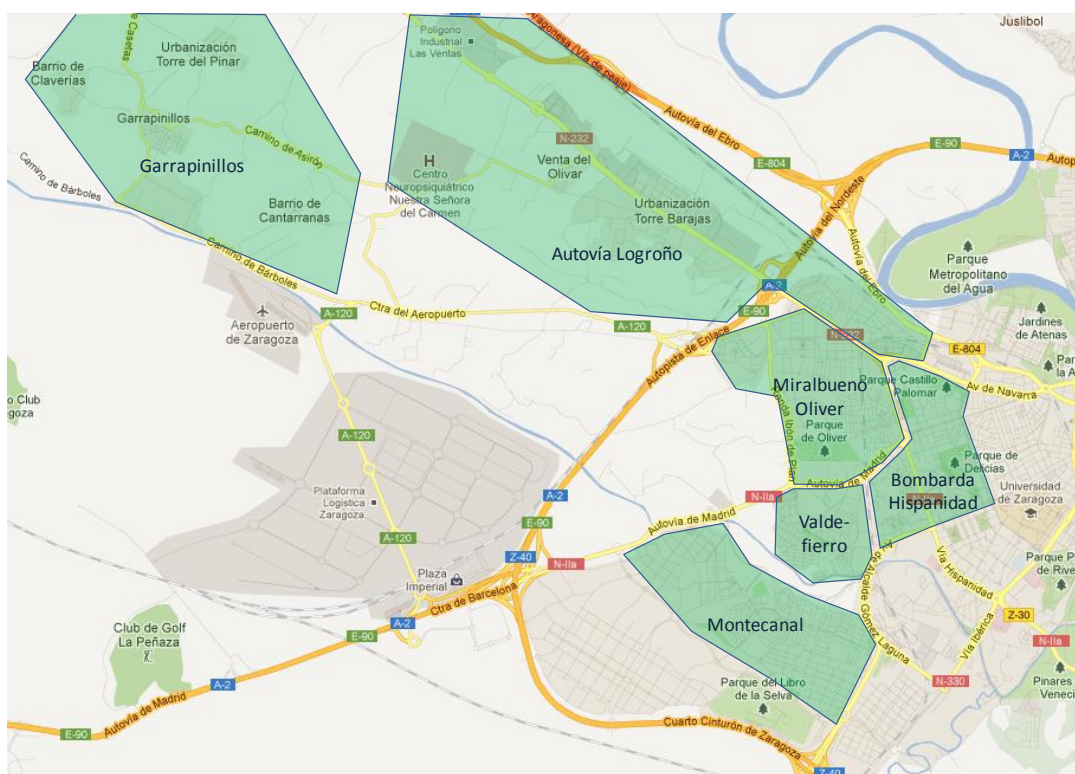


Figura 20. Zonas incluidas en el estudio

#### 4.1.2. Periodo de estudio

Las muestras se tomaron entre los meses de Enero y Abril de 2012, época en que se realiza habitualmente la campaña de prevención frente a *Leishmania*, ya que el periodo de actividad de los flebótomos se prolonga a veces hasta Octubre (Galvez et al, 2010b) y el tiempo medio estimado necesario para la seroconversión en animales infectados naturalmente es de 5 meses, pudiendo variar entre 1 y 22 meses (Martínez et al, 2011).

#### 4.1.3. Selección de los participantes

Una vez definida el área de estudio y el periodo de estudio, se procedió a definir el resto de los criterios de inclusión-exclusión para la selección de los participantes.

Se excluyó a los animales menores de un año de edad, para que los perros al menos hubieran estado expuestos a dos periodos de actividad del vector.

No se seleccionaron animales con una sintomatología severamente manifiesta de la enfermedad (caquexia, úlceras, etc) ya que nuestro objetivo es la evaluación epidemiológica de una población asintomática.



Así mismo se excluyeron a los animales que vivían constantemente en interiores, pues no tienen posibilidad de contactar con el vector. Por ello todos los animales incluidos en la muestra paseaban como mínimo una vez al día.

Finalmente se excluyó a animales que ya habían sido seropositivos (mediante IFI) en años anteriores a 2011, incluso aquellos animales que en años anteriores tras un título bajo de anticuerpos, seronegativizaron.

El tamaño de muestra se calculó teniendo en cuenta que la seroprevalencia en Zaragoza en 2005 a principio de la temporada de actividad del vector era de 9,2% (Peris, 2010), y asumimos una precisión del 7% y un nivel de confianza del 95%. El resultado fue de 89 animales al calcularlo con la versión 2.0 del WinEpi (<http://www.winepi.net>) asumiendo una distribución binomial entre 2 y 16%. Con el fin de evitar pérdidas de información se aumentó la muestra un 10%.

Todos los propietarios que decidieron que sus animales participasen en el estudio, lo hicieron de modo voluntario, sin obtener ningún beneficio y sin que existiera ningún conflicto de intereses.

Respetando todos estos parámetros, obtuvimos una muestra final de 98 perros de más de 1 año de edad, que habitan en el área periurbana circundante a Miralbueno.

#### **4.1.4. Diseño del estudio**

Realizamos un estudio observacional retrospectivo, asimilable a un diseño caso-control, ya que establecimos el estado de infección en los animales en el momento de la toma de muestra y lo comparamos con distintas variables intrínsecas y extrínsecas correspondientes a momentos anteriores a la toma de muestras.

#### **4.1.5. Extracción de sangre**

La muestra de elección para la realización de ambas pruebas se obtuvo a partir de sangre de venas periféricas, y concretamente se extrajo de la vena cefálica.

A partir de los controles rutinarios efectuados en la clínica correspondientes a la campaña anual de control frente a la leishmaniosis, durante la misma visita y aprovechando la venopunción realizada para la obtención de sangre para el diagnóstico rutinario por IFI, se extrajeron a cada animal 0,5 ml de sangre adicionales para la realización de la qPCR.

La muestra de sangre destinada al diagnóstico directo se mantuvo en tubos con una concentración de anticoagulante EDTA adecuada para el volumen de muestra extraída, y se almacenaron refrigeradas a temperatura entre 0-5°C hasta su procesamiento en un plazo inferior a 48 h, con el fin de prevenir alteraciones del DNA.

Por otra parte, las muestras destinadas a serología, se mantuvieron en tubos sin ningún tipo de anticoagulante para permitir que se produjese la precipitación del coágulo sanguíneo y obtener como sobrenadante el suero con los anticuerpos. Estas muestras

fueron remitieron diariamente para ser procesadas por un laboratorio externo; hasta el envío se mantuvieron en refrigeración entre 0-5°C.

## 4.2. Técnicas diagnósticas

Como ya se ha referenciado en el apartado de revisión bibliográfica, existen diversas técnicas para el diagnóstico de esta enfermedad.

Uno de nuestros objetivos era comparar técnicas indirectas, como son las técnicas serológicas, frente a técnicas directas basadas en la biología molecular, la qPCR en nuestro estudio.

### 4.2.1. Diagnóstico por IFI

Como ya se ha comentado la muestra serológica de elección en este caso es IFI, debido a que es la técnica de uso rutinario en la clínica, y la considerada como una de las técnicas de referencia por la OMS para el diagnóstico de la enfermedad (WHO, 2010) y considerada como “*Gold Standard*” por otros (Maia y Campino, 2008). Las ventajas e inconvenientes ya han sido comentados previamente y por tanto no los repetiremos aquí.

Para la determinación serológica se utilizó una preparación comercial de antígenos a partir de promastigotes (Biomerieux, Francia), y se consideraron como positivos los títulos iguales o superiores a 1/80.

### 4.2.2. Diagnóstico por qPCR

Como ya hemos indicado la PCR es una técnica que amplifica un segmento específico de DNA *in vitro* y obtener muchas copias de éste.

Como ya se ha comentado se tomaron muestras de 0,5 ml de sangre entera por animal. El procesamiento de la muestra, extracción del DNA y realización de la qPCR se llevaron a cabo en los laboratorios de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, del Departamento de Patología Animal, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

La **extracción del DNA** se llevó a cabo utilizando un kit comercial (Mobio, BioRAD, EE.UU.) ya preparado. Este kit cuenta con las distintas soluciones (B1 a B5) y su uso se explica detalladamente a continuación. La extracción de DNA mediante métodos basados en el uso de la Proteinasa K sobre sangre, como es nuestro caso, han demostrado ser adecuados y poseer una sensibilidad suficiente como para evitar la necesidad de muestras más invasivas (Lachaud et al, 2001).

De los 0,5 ml de sangre muestra se pipetea 200 µl a un tubo Eppendorf de 2 ml y añadimos 10 µl de Proteinasa K. A continuación se añaden 200 µl de la solución B1 del kit, la cual contiene un detergente y sales caotrópicas que favorecen la entropía del DNA y las proteínas presentes en la muestra. Para que esto se lleve a cabo se deben mezclar las sustancias mediante agitación en el vortex durante 15 s. Después se incuba la muestra a 65°C durante 10 min para completar la degradación proteica y la lisis celular. Una vez realizado este paso, se centrifuga brevemente para que se pueda recoger toda la muestra.

Posteriormente se añaden 200 µl de la solución B2 (etanol al 100%), y se homogeniza mediante el vortex durante 15 s aproximadamente y se realiza un breve centrifugado para poder recoger bien la muestra. Este paso genera unas condiciones óptimas en la muestra para la unión del DNA.

Se transfiere la muestra obtenida a un Spin Filter (tubos especiales que poseen una membrana de sílice a la que se une el DNA por afinidad de cargas) y se centrifuga durante 1 min a 13.000 g. Durante este paso el DNA que se ha vuelto insoluble por la mezcla con el alcohol, se mantiene en suspensión y posee cargas eléctricas negativas se une a la membrana la cual está saturada de sales con cargas positivas, mientras que el resto de sustancias solubles, y de un tamaño inferior al poro, fluyen a través de esta membrana (proteínas desnaturalizadas y RNA).

El siguiente paso consiste en colocar este filtro, en un nuevo tubo y añadir 500 µl de la solución B3. Esta es una solución de lavado con sales, para limpiar las impurezas de la membrana a la cual se ha unido el DNA. Se centrifuga durante 30 s a 13.000 g, luego se retira el filtro y se coloca en un tubo nuevo.

Se añade entonces 500 µl de la solución B4. Esta es otra solución de lavado consistente etanol la cual limpia el DNA unido a la membrana y elimina las sales contaminantes que pudieran quedar del paso anterior. Para lograr esto se centrifuga nuevamente durante 30 s a 13.000 g.

Se vuelve a colocar el filtro en un tubo nuevo, y esta vez se centrifuga para secar la membrana de etanol, durante 30 s a 13.000 g, con el fin de evitar interferencias con aplicaciones posteriores (RT y PCR, clonación, etc)

Finalmente se lleva esta membrana a un nuevo tubo, y se añaden 200 µl de la solución B5 (10 mM Tris y 1 mM EDTA), que se mantienen durante 5 min a 65 °C para favorecer la elución y a continuación se centrifuga durante 1 min a 13.000 g. Mediante el paso de la solución 5 por la membrana, se logra diluir las sales presentes y por tanto romper su unión con el DNA. De este modo el DNA que estaba unido a la membrana pasa al tubo y ya está listo para ser utilizado.

La **amplificación** del material genético obtenido se realizó utilizando una qPCR con un termociclador CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System, BioRad, España.

Los elementos de una PCR son DNA molde, cebadores, DNA polimerasa, un tampón, nucleótidos (dNTP) y MgCl. El cebador se extiende por la DNA polimerasa utilizando la cadena complementaria como molde, el sentido de la extensión es 3'-5'. La DNA polimerasa de elección es la Taq DNA polimerasa, es termoestable y su temperatura óptima de actuación es de 72-74°C.

Cada ciclo se inicia con la desnaturalización de las dos cadenas del DNA mediante una elevación de la temperatura para separar las cadenas de DNA (cerca de 95°C). Después se produce la hibridación (*annealing*) de los cebadores complementarios a las secuencias de los extremos del DNA a amplificar (entre 40°C y 65°C), y el ciclo finaliza con la extensión (elongación) del cebador por la Taq polimerasa.

La cantidad de DNA se duplica en cada ciclo de PCR, así que en  $n$  ciclos tendremos  $2^n$  copias. En la amplificación se observa una fase logarítmica-lineal alcanzándose una fase de meseta porque la reacción no puede mantenerse indefinidamente debido al consumo de los dNTP.

En la qPCR se registra la intensidad de la fluorescencia en cada ciclo lo que nos permite observar la cinética de la reacción.

Los cebadores utilizados son: 5'-CCTATTTTACACCAACCCCAAGT-3' (JW11); reverse, 5'-GGGTAGGGGCGTTC TGCGAAA-3' (JW12) propuestos por Nicolas y cols. (2000), los cuales amplifican un fragmento de 120 pb del minicírculo del DNA del kinetoplasto (kDNA).

En nuestro trabajo se utilizó qPCR con SYBR Green y una Master Mix 2X, lo cual ha facilitado la reproducibilidad de la prueba. El único inconveniente de este tinte es que se une a cualquier tipo de dsDNA amplificado. Por lo cual para poder concluir que el resultado es específico se realizaron curvas de fusión (Melting Curve).

Para cada muestra se realizó una dilución 1:10 con objeto de minimizar posibles inhibiciones. Así mismo en cada placa se añadieron 2 negativos para evaluar las posibles contaminaciones.

El protocolo seguido se basó en la realización de 44 ciclos, en los que cada ciclo se divide en cinco pasos (Tabla 1).

El primer paso consiste en una subida a 95°C (temperatura de desnaturalización del DNA) que se mantiene durante 7 min para que se active la Hot Start Taq Polimerasa. En el segundo paso la temperatura cae a 55°C (temperatura de hibridación de los cebadores), y se mantiene así durante 20 s para que el aparato registre digitalmente la fluorescencia producida. A partir de este momento se inicia el tercer paso, en el que se aumenta la temperatura hasta llegar a 72°C (temperatura óptima de trabajo de la Taq), que se mantiene unos 20 s, tiempo suficiente para que la Taq polimerasa copie toda la secuencia de nucleótidos. Se estima que la velocidad a la que copia esta enzima es de 1.000 pb/min. Como el segmento que queremos copiar es de unas 120pb, 20 s son más del doble del tiempo necesario. En el cuarto paso se registra de nuevo la fluorescencia, a 79°C porque se considera que a esta temperatura las posibles inespecificidades (dímeros del cebador) estarán desnaturalizadas mientras que nuestro producto, cuya temperatura específica de desnaturalización es 83,5°C, seguirá teniendo las cadenas unidas por lo que la fluorescencia emitida pertenecerá exclusivamente a las copias de DNA de *Leishmania*. Finalmente (quinto paso) la temperatura seguirá subiendo y se mantiene a 94°C unos 15 s, en este paso todo el DNA estará desnaturalizado y comienza de nuevo el ciclo (Tabla 1).

Finalmente una vez que se han realizado los 44 ciclos, y ya se ha formado todo nuestro producto, se realiza la curva de fusión, que consta de tres pasos. Se mantiene 20 s a 94°C para que todo el DNA esté desnaturalizado y va disminuyendo la temperatura hasta 65°C donde ya estarán unidas las hebras de DNA que nos interesa, y de nuevo sube la temperatura hasta 94°C para volver a desnaturalizarse. Durante este proceso se

registra la fluorescencia cada 0,5°C para poder generar la curva que nos permitirá comprobar la especificidad de nuestro producto (Tabla 1).

Tabla 1. Protocolo utilizado en la realización de la qPCR

PCR a Tiempo Real			
	Temperatura	Tiempo	Repeticiones
1º Paso	95°C	7 min	
2º Paso	55°C	20 s – Registro fluorescencia	x 44 ciclos
3º Paso	72°C	20 s	
4º Paso	79°C	Registro fluorescencia	
5º Paso	94°C	15 s	
Curva de fusión	94 °C	20 s	
	65°C	5 s	
	95 °C y 4º C	En espera	

Una vez realizada la qPCR, el cálculo de las copias de DNA al origen, se realizó mediante la aplicación de un cálculo teórico a partir de la CT obtenida, asumiendo una eficiencia óptima del 100%. La curva de ajuste sería  $y = -3.33x + 39$ .

### 4.3. Encuestas Epidemiológicas

Para recoger todos los datos incluidos en el estudio, elaboramos una encuesta (Anexo 1) en la que se recogió en primer lugar los datos de identificación del animal, su número de ficha en la clínica, y se le asignó un número de encuesta dentro del estudio para codificar las muestras obtenidas, así como la fecha en que se realizó.

En cuanto a la información sobre el animal, se recogieron datos acerca de las siguientes variables intrínsecas: edad (categorizada en tres grupos: 1-5 años, 5-10 años y >10 años), sexo y si estaba o no esterilizado, aptitud (compañía o guarda), longitud del pelo (corto, medio o largo), color de la capa (claro, medio u oscuro), peso (kg) y raza.

En cuanto a los factores extrínsecos relacionados con la exposición a la infección, se recogió información sobre el lugar de residencia (limitando a los barrios ya seleccionados como criterio de inclusión), tipo de alojamiento (interior o exterior), aplicación de tratamientos preventivos antimosquitos (collares o pipetas) y si la prevención se realizaba durante todo el año o solamente en época de riesgo (verano). Además también se recogió información sobre la realización de estancias temporales en lugares considerados de mayor riesgo por mayor exposición al vector (costa mediterránea y guarderías caninas), y finalmente los horarios de paseo de los animales.

Por último se recogieron los datos clínicos del paciente: estado de los principales linfonodos, presencia de signos clínicos asociados a la enfermedad (diarreas, úlceras, cojeras o alopecias) y la condición corporal.

La mayoría de estas variables son las que generalmente se han estudiado ya en diversos estudios anteriores en distintas localizaciones (Galvez et al 2010), y que se han asociado

con la prevalencia de infección y la presentación clínica de la Leishmaniasis, pero hasta nuestro conocimiento no existen referencias bibliográficas que asocien dichas variables con la carga parasitaria.

Con el fin de facilitar el posterior tratamiento estadístico de los datos los formularios utilizados en la encuesta fueron implementados en una base de datos Microsoft Access 2007 para Windows.

#### **4.4. Análisis estadístico y epidemiológico**

En primer lugar se describieron las distintas variables recogidas, de forma que se utilizaron tablas de frecuencias para caracterizar las variables cualitativas, mientras que las variables cuantitativas fueron descritas mediante el cálculo de la media y la desviación estándar.

Para establecer la existencia de asociaciones estadísticamente significativas entre las distintas variables se estableció el error alfa en 0,05. La asociación entre variables cualitativas se determinó mediante la prueba Chi-cuadrado de Pearson, y cuando dicha prueba no fue aplicable (más de un 20% de valores esperados en la tabla de contingencia menores de 5) se aplicó la prueba de Razones de Verosimilitudes (*Likelihood Ratio test*) o la prueba exacta de Fisher si se trataba de tablas de contingencia de 2x2 (Daniel, 2000).

Para comparar las medias de una variable cuantitativa entre las distintas categorías de una variable cualitativa se determinó en primer lugar la homoscedasticidad de las variables cuantitativas en cada categoría aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar si seguían una distribución normal. Si las distribuciones de los datos eran compatibles con la distribución normal se aplicaron las pruebas paramétricas de t de Student (para comparar dos medias) o de Análisis de Varianza ANOVA (para comparar más de dos medias), comprobando la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene y utilizando las significaciones estadísticas correspondientes. En caso de que las distribuciones de los datos no fueran normales se utilizaron las pruebas no paramétricas alternativas: U de Mann-Whitney (para comparar dos medias) o Kruskal-Wallis (para comparar más de dos medias) (Daniel, 2000).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 17.0 para Windows.

En relación con los análisis epidemiológicos se estableció la concordancia entre dos pruebas diagnósticas calculando el coeficiente kappa de Cohen (Thrusfield, 2007). Por otra parte se calcularon las prevalencias aparentes de infección dividiendo el número de positivos por el total de la muestra y se calcularon los intervalos de confianza del 95% utilizando el método Score de Wilson (Dohoo, 2006; Wilson, 1927).

Los análisis epidemiológicos fueron realizados con los programas SPSS 17.0 para Windows y WinEpi (<http://www.winepi.net>).

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Descripción de la muestra seleccionada

Tal y como se indicó en el apartado de Material y Métodos, se recogió una muestra formada por 98 perros asintomáticos seleccionados en una zona endémica. En la Tabla 2 se muestra la distribución de la muestra según el sexo y la edad. La distribución por sexos fue similar en cada categoría de edad, con una proporción similar en ambos sexos. Casi la mitad de los animales tuvieron entre 1 y 5 años, cuatro de cada diez tenían entre 6 y 10 años y uno de cada siete tenían más de 10 años.

Tabla 2. Distribución del sexo estratificada por la edad (n=98)

		Sexo		Total	
		Macho	Hembra	%	n
Edad	1-5 años	57,4%	42,6%	<b>48,0%</b>	47
	6-10 años	47,4%	52,6%	<b>38,8%</b>	38
	>10 años	61,5%	38,5%	<b>13,3%</b>	13
Total	%	<b>54,1%</b>	<b>45,9%</b>		
	n	53	45		

Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson, p=0,550

En la encuesta se recogió la información relativa a la esterilización de los animales, no observándose diferencias significativas según el sexo en la proporción de individuos esterilizados (machos castrados o hembras ovariectomizadas) (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de esterilización estratificada por sexo (n=98)

Sexo	Esterilizado	
	n	%
Macho	53	20,8%
Hembra	45	17,8%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>19,4%</b>

Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson, p=0,710

El rango de pesos en la muestra estudiada varió entre 2 y 47 kg, con un peso medio de  $19,42 \pm 11,11$  kg, sin que se apreciaran diferencias significativas entre sexos (Tabla 4).

Tabla 4. Caracterización del peso (kg) (media  $\pm$  DS) según el sexo (n=98)

Sexo	n	Peso (kg)
Macho	53	$18,28 \pm 10,71$
Hembra	45	$20,76 \pm 11,53$
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b><math>19,42 \pm 11,11</math></b>

Significación estadística según prueba t de Student para muestras independientes, p=0,274

Debido a que los animales fueron seleccionados entre los clientes de una clínica veterinaria, y por tanto la variación de las razas no permitía establecer comparaciones entre ellas, se decidió clasificar a los animales en función de su tamaño (Tabla 5). Podemos observar que, a excepción de los animales considerados de tamaño “Toy” que representan un 10%, el resto de categorías se distribuyen de forma similar con frecuencias de aproximadamente un 30%.

Tabla 5. Distribución de la muestra por talla

Talla	Frecuencia
Toy	10,2%
Pequeño	26,5%
Mediano	33,7%
Grande	29,6%
<b>Total (n)</b>	<b>98</b>

En la Tabla 6 se muestra la distribución de la muestra según la longitud del pelo y color de la capa. Es destacable que la proporción de perros con pelo largo claro o intermedio es menor al resto.

Tabla 6. Distribución de las capas en función de la longitud del pelo

Longitud del pelo	Color de capa			Total	
	Claro	Intermedio	Oscuro	%	n
Corto	20,4%	9,2%	7,1%	<b>36,7%</b>	36
Medio	17,3%	11,2%	11,2%	<b>39,8%</b>	39
Largo	5,1%	6,1%	12,2%	<b>23,5%</b>	23
<b>Total</b>	<b>42,9%</b>	<b>26,5%</b>	<b>30,6%</b>		
%	<b>42,9%</b>	<b>26,5%</b>	<b>30,6%</b>		
n	42	26	30		

Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson,  $p=0,065$

En la Tabla 7 se muestra la distribución de los animales encuestados en función de su lugar de residencia. Siete de cada diez perros proceden del área metropolitana de Miralbueno-Oliver, lo cual se explica teniendo en cuenta la localización de la clínica.

Tabla 7. Distribución de la muestra según la zona de residencia

Zona de residencia	Frecuencia
Garrapinillos	5,1%
Autovía de Logroño	8,2%
Miralbueno-Oliver	69,4%
Valdefierro	9,2%
Bombarda-Hispanidad	6,1%
Montecanal	2,0%
<b>Total (n)</b>	<b>98</b>



En la encuesta se recogió información sobre el tipo de alojamiento en que viven los animales, considerando alojamiento exterior tanto a los animales que viven en parcelas como los que viven en chalets o casas con acceso ilimitado al jardín o terraza a voluntad del animal. La Tabla 8 muestra que dos tercios de los animales encuestados viven en el interior de la casa mientras que un tercio tienen acceso continuo al exterior.

Tabla 8. Distribución de los animales encuestados según el alojamiento

Alojamiento	Frecuencia
Interior	65,3%
Exterior	34,7%
<b>Total (n)</b>	<b>98</b>

También se recogió información acerca de los desplazamientos puntuales a zonas que consideramos pueden aumentar el riesgo de infectarse, como son zonas de la costa mediterránea donde abundan más los flebotomos, y guarderías donde los animales están en contacto entre ellos y hay más posibilidades de que sean picados por los vectores. La Tabla 9 nos muestra que uno de cada tres perros viaja al área mediterránea, e igualmente uno de cada tres se aloja temporalmente en guarderías. Tan solo un 6% viaja a otros lugares. La estancia en uno de estos grupos no es excluyente de otro.

Tabla 9. Desplazamientos a otros lugares de los animales encuestados

Desplazamiento	Frecuencia
Mediterráneo	31,6%
Guardería	30,6%
Otro lugar	6,1%

Sabemos que los horarios de mayor actividad de los flebotomos son el amanecer y el anochecer. Por tanto quisimos estudiar el régimen de paseos de los animales muestreados, para lo cual dividimos el día en cinco franjas no excluyentes entre ellas.

La Tabla 10 nos muestra que el régimen de paseo es similar para todas las franjas horarias.

Tabla 10. Horarios de paseo de los animales encuestados.

Paseo	Frecuencia
Amanecer	61,2%
Mañana	80,6%
Tarde	78,6%
Anochecer	82,7%
Noche	73,5%
<b>Total (n)</b>	<b>98</b>

Finalmente, para acabar de describir la muestra, valoramos el uso de distintos métodos de profilaxis contra la picadura del flebotomo. Los resultados mostrados en la Tabla 11 indican que la mitad de los animales muestreados utilizan collares; mientras que tres cuartas partes

utilizan pipetas. Por tanto la utilización de la pipeta está más generalizada, probablemente debido a que los propietarios consideran los collares como un método más molesto. En cualquier caso la gran mayoría de los animales no están protegidos durante todo el año, y se aplican estos productos solo durante las épocas de actividad de los insectos.

Tabla 11. Distribución de animales según la utilización de repelentes

		Collar		Total		Protección anual
		No	Sí	%	n	
Pipeta	No	66,7%	33,3%	<b>21,4%</b>	21	91,8%
	Sí	40,3%	59,7%	<b>78,6%</b>	77	8,2%
Total	%	<b>45,9%</b>	<b>54,1%</b>			
	n	45	53			

Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson,  $p=0,031$

## 5.2. Concordancia diagnóstica

Estudiamos la concordancia entre ambas pruebas diagnósticas utilizadas en este estudio (Tabla 12). Como se puede observar ambas pruebas son totalmente discordantes, mostrando un coeficiente kappa cercano a 0. Esto concuerda con experiencias de otros autores (Morales-Yuste et al, 2012) y se explica debido a que mientras que la qPCR detecta todos los animales que han sido picados e infectados, es decir que presentan carga antigénica; la IFI solo detecta a aquellos que han seroconvertido.

En nuestro estudio todos los animales considerados IFI positivos, tuvieron un resultado correspondiente a una baja titulación (título 1/80). El caso de los dos animales IFI positivos y qPCR negativos tiene varias explicaciones posibles. Pueden ser falsos positivos, debido a la presencia de reacciones cruzadas, aunque otra alternativa más probable es que estos animales sufrieran una alta parasitemia en verano que generó anticuerpos los cuales permanecen presentes durante un tiempo después de que el animal haya podido controlar la infección. En ambos casos se repitió la serología al mes y el resultado fue negativo, y ambos casos mostraban presencia de producto específico en la qPCR pero a CT demasiado altas por lo que se consideraron negativos.

Tabla 12. Concordancia Diagnóstica entre IFI y qPCR

		IFI		Total
		Negativo	Positivo	
qPCR (CT<38)	Negativo	39	2	41
	Positivo	51	6	57
Total		90	8	98

Coeficiente Kappa de Cohen = 0,048 ( $p=0,314$ )

### 5.3. Prevalencias de Leishmaniosis

Para caracterizar el estatus sanitario de la muestra, estimamos la seroprevalencia (mediante IFI) y la prevalencia de infección (mediante qPCR). Este es el principal objetivo de nuestro estudio, y los resultados los muestra la Tabla 13. La seroprevalencia observada por IFI es tan solo de un 8,2%, mientras que la detectada por qPCR es 7 veces mayor. Este dato es de vital importancia para la realización de estudios epidemiológicos, pues corrobora una de nuestras hipótesis y se corresponde con estudios realizados por otros autores en la misma zona (Castillo et al, 1984; Peris, 2010), en los que se cita que las prevalencias estimadas hasta la fecha mediante técnicas serológicas subestimaban los valores reales de infección. La importancia de este dato radica en que todos los animales que no estaban siendo considerados como fuentes de riesgo en realidad son una posible fuente de infección para los flebótomos.

Tabla 13. Prevalencias y cargas parasitarias de los perros muestreados (n= 98)

	n	Prevalencia	IC (95%)
IFI	8	8,16%	4,19-15,29%
qPCR (CT<38)	57	58,16%	48,27- 67,44%
		Media	SD
qPCR	57	73,94	83,96
CT	57	35,73	1,48

Para estudiar más a fondo estos valores, comparamos las diferencias entre la media de la carga parasitaria expresada en amastigotes/ml sangre o en CT “Cycle Threshold” o ciclo umbral. Recordemos que este término es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias del gen en la muestra original, por tanto al ser una expresión logarítmica su variación es menor.

Estudiamos las cargas parasitarias en animales seropositivos y seronegativos. La Tabla 14 no muestra diferencias significativas entre los valores de ambos grupos; obteniendo una carga media de la muestra de 73,94 amastigotes/ml y una CT de 35,73, sin observar diferencias entre animales seropositivos o seronegativos.

Tabla 14. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) de los perros positivos por qPCR

IFI	n	qPCR	CT
IFI Seronegativos	51	74,52 $\pm$ 86,99	35,75 $\pm$ 1,54
IFI Seropositivos	6	69,00 $\pm$ 57,10	35,55 $\pm$ 1,04
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
p		0,880 <sup>t</sup>	0,757 <sup>t</sup>

<sup>t</sup> Significación estadística según prueba t de Student

#### 5.3.1. Asociación con las variables intrínsecas

La Tabla 15a nos muestra la relación entre la edad de los animales encuestados y la prevalencia medida por ambas técnicas. Aunque no se obtienen resultados

estadísticamente significativos, sí que podemos observar una clara tendencia de que conforme aumenta la edad aumenta el número de animales que han desarrollado anticuerpos, lo cual coincide con estudios revisados (Galvez et al, 2010; Sousa et al 2011), mientras que el porcentaje de infectados es prácticamente el mismo. Esto nos parece lógico ya que la probabilidad de infectarse durante el último periodo de actuación del flebótomo es la misma para todos los animales independientemente de su edad.

Tabla 15a. Prevalencias (%) estratificadas según la edad

Edad	n	IFI		qPCR (CT<38)	
		%	IC (95%)	%	IC (95%)
1-5 años	47	2,1	0,38-11,11%	53,2	41,25-68,59%
6-10 años	38	13,2	5,75-27,33%	57,9	42,19-72,15%
>10 años	13	15,4	4,33-42,24%	69,2	42,37-87,32%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
P		0,083 <sup>C</sup>		0,582 <sup>LR</sup>	

<sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson <sup>LR</sup> Significación estadística según prueba Likelihood Ratio

Cuando comparamos la edad con la carga parasitaria dentro de los animales positivos por qPCR (Tabla 15b), vemos una tendencia a aumentar la carga con la edad de los animales, comprensible ya que al aumentar la edad han aumentado el número de periodos de exposición a picaduras, y por tanto habrán sido infectados más veces. Por el contrario, cuando analizamos la edad respecto a la carga expresada en CT, vemos que lógicamente ésta disminuye con la edad, y en este caso de forma significativa.

Tabla 15b. Cargas parasitarias (media ± SD) estratificadas según la edad

Edad	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
1-5 años	26	58,04 ± 80,79	36,15 ± 1,28
6-10 años	22	78,85 ± 81,38	35,64 ± 1,43
>10 años	9	107,89 ± 96,83	34,76 ± 1,80
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 ± 83,96</b>	<b>35,73 ± 1,48</b>
P		0,379 <sup>KW</sup>	0,048 <sup>A</sup>

<sup>KW</sup> Significación estadística según Kruskal-Wallis, <sup>A</sup> Significación estadística según prueba ANOVA

En la Tabla 16a se muestra la diferencia en la prevalencia en función del sexo. Vemos una asociación significativa clara (p=0,001) en el caso de la seroprevalencia. En cambio en cuanto a la prevalencia estimada por qPCR no se aprecian diferencias significativas entre ambos sexos.

Esto es indicativo de que el flebótomo no tiene predilección por sexos ya que ambos muestran prevalencias similares de infección, aunque en nuestra muestra fueron exclusivamente las hembras las que desarrollaron anticuerpos. Sin embargo estos resultados no coinciden con estudios realizados en un ámbito similar por Peris en 2010, que en una muestra de 687 perros no encontraron diferencias significativas de seroprevalencias según el sexo. Esta autora comenta la existencia de distintos trabajos

con resultados contradictorios en relación al papel del sexo en la infección por *Leishmania*, y que podría deberse a la aptitud de los animales.

Tabla 16a. Prevalencias aparentes estratificadas según el sexo

Sexo	n	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
Macho	53	0,00%	0,00 - 6,76%	62,26%	48,81 - 74,06%
Hembra	45	17,78%	9,29 - 31,33%	51,11%	37,00 - 65,04%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
p		0,001 <sup>c</sup>		0,192 <sup>c</sup>	

<sup>c</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

En cuanto a la carga parasitaria, la Tabla 16b muestra las medias calculadas en función del sexo, nos muestra que los machos presentaron una carga parasitaria prácticamente doble a la de las hembras, con una significación de 0,040; mientras que si las expresamos por CT no encontramos diferencia alguna. Por tanto con la información obtenida por ambas tablas, podemos interpretar que las hembras a igual CT que los machos son más susceptibles a desarrollar la anticuerpos.

Tabla 16b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificadas según el sexo

Sexo	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
Macho	34	90,40 $\pm$ 100,37	35,54 $\pm$ 1,65
Hembra	23	49,60 $\pm$ 42,34	36,01 $\pm$ 1,18
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
P		0,040 <sup>t</sup>	0,220 <sup>t</sup>

<sup>t</sup> Significación estadística según prueba t de Student

Hemos querido estudiar la posible influencia del tamaño del animal (Tabla 17a), y tras el análisis estadístico no podemos afirmar que haya diferencias entre los distintos tamaños de los animales, aunque parece que se observa una tendencia a que los animales de mayor tamaño tengan más probabilidad de ser seropositivos. Esto podría deberse a que en general los animales de tamaño “Toy” o “Pequeño” son animales que viven dentro de casa y están mejor cuidados que los de tamaño “Mediano” o “Grandes”, lo cual ya ha sido descrito antes (Galvez et al, 2010).

Tabla 17a. Distribución de positivos estratificada por la talla

Talla	n	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
Toy	10	0,0%	0,00-27,25%	60%	31,27-83,18%
Pequeño	26	3,80%	0,68-18,89%	57,7%	38,95-74,46%
Mediano	33	6,10%	1,68-19,61%	66,7%	49,61-80,25%
Grande	29	17,2%	7,60-34,55%	48,3%	31,39-65,57%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
P		0,159 <sup>LR</sup>		0,539 <sup>C</sup>	

<sup>LR</sup> Significación estadística según Razón de Verosimilitudes. <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

En cuanto a la carga parasitaria de los animales positivos, estratificados por las tallas, no observamos diferencias significativas, lo cual nos incita a pensar que todos son infectados por igual (Tabla 17b).

Tabla 17b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificada por la talla

Talla	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
Toy	6	35,66 $\pm$ 35,06	36,48 $\pm$ 1,34
Pequeño	15	106,86 $\pm$ 87,70	35,23 $\pm$ 1,75
Mediano	22	80,04 $\pm$ 87,70	35,57 $\pm$ 1,47
Grande	14	45,47 $\pm$ 34,55	36,19 $\pm$ 1,07
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
P		0,151 <sup>A</sup>	0,182 <sup>A</sup>

<sup>A</sup> Significación estadística según ANOVA

Estudiando la posible relación con la longitud del pelo, y a diferencia de otros estudios que consideran el pelo corto como un factor de riesgo (Cortes et al, 2012) la Tabla 18a de nuestro estudio refleja que no se encontraron diferencias significativas en la prevalencia con ninguna de las dos pruebas diagnósticas. Consideramos que la longitud del pelo ha sido erróneamente clasificada como un factor de riesgo, ya que en realidad leyendo detalladamente el estudio previamente citado, vemos que la prevalencia de infectados de pelo medio y corto es prácticamente la misma, mostrando solo diferencias significativas con el pelo largo.

Tabla 18a. Distribución de positivos estratificada por la longitud del pelo

Long. Pelo	n	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
Corto	36	5,6%	1,54-18,14%	55,6%	39,58-70,46%
Medio	39	10,3%	4,06-23,58%	61,5%	45,90-75,11%
Largo	23	8,7%	2,42-26,80%	56,5%	36,81-74,37%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
p		0,746 <sup>LR</sup>		0,857 <sup>C</sup>	

<sup>LR</sup> Significación estadística según Razón de Verosimilitudes. <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

En cuanto a la carga parasitaria, tampoco se observan diferencias significativas entre las diferentes longitudes de pelo (Tabla 18b).

Tabla 18b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificada por la longitud del pelo

Long. Pelo	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
Corto	20	75,25 $\pm$ 92,27	35,76 $\pm$ 1,64
Medio	24	59,48 $\pm$ 56,84	35,87 $\pm$ 1,32
Largo	13	98,61 $\pm$ 109,79	35,43 $\pm$ 1,58
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
P		0,406 <sup>A</sup>	0,693 <sup>A</sup>

<sup>A</sup> Significación estadística según ANOVA

Estudiamos la influencia del color de la capa sobre las prevalencias. Se establecieron tres categorías en cuanto al color del pelo, considerando claros los animales de pelo blanco o rubio, medios los tonos grises y marrones tostados, y oscuros los animales de pelo negro, marrón chocolate y todas aquellas mezclas en que predominasen los colores oscuros. Aunque los resultados no son significativos, si se observa claramente en la Tabla 19a que los perros de colores medio y oscuro tienen más del doble de prevalencia que los de capa clara.

Tabla 19a. Distribución de positivos estratificada por el color del pelo

Color Pelo	n	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
Claro	42	4,8%	1,32-15,79%	54,8%	39,95-68,98%
Medio	26	11,5%	4,0-28,78%	61,5%	42,53-77,57%
Oscuro	30	10,0%	3,46-25,62%	60,0%	42,32-75,41%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
p		0,540 <sup>LR</sup>		0,834 <sup>C</sup>	

<sup>LR</sup> Significación estadística según Razón de Verosimilitudes; <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

En cuanto a la carga parasitaria, los animales de color de pelo medio parecen tener menores valores de parasitemia, sin ser este dato significativo (Tabla 19b). Por tanto en cuanto a este parámetro, no podemos establecer ninguna asociación con la infección.

Tabla 19b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificada por el color del pelo

Color Pelo	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
Claro	23	81,9 $\pm$ 106,04	35,75 $\pm$ 1,58
Medio	16	50,81 $\pm$ 39,15	36,12 $\pm$ 1,25
Oscuro	18	84,33 $\pm$ 81,32	35,36 $\pm$ 1,55
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
P		0,436 <sup>A</sup>	0,331 <sup>A</sup>

<sup>A</sup> Significación estadística según ANOVA

### 5.3.2. Asociación con las variables extrínsecas

Consideramos a estudio las variables extrínsecas relacionadas tanto con la profilaxis realizada (uso de collares o pipetas), el manejo del animal (horario de paseo, estancias en otros lugares) y el tipo de hábitat.

La Tabla 20a estudia la relación entre el uso de pipetas (Imidacloprid + Permetrina) y las prevalencias obtenidas. Vemos que se presenta una clara tendencia (con una significación  $p=0,062$ ), de que los animales a los cuales no se les aplica la pipeta presentan una prevalencia de seroconversión casi cuatro veces mayor con respecto a los que si utilizan.

Tabla 20a. Prevalencias estratificadas según el uso de pipeta

Pipeta	N	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
No	21	19%	7,67-40%	57,1%	36,55-75,53%
Si	77	5,2%	2,04-12,68%	58,4%	47,29-68,79%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
p		0,062 <sup>F</sup>		0,915 <sup>C</sup>	

<sup>F</sup> Significación estadística según prueba exacta de Fisher. <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

Sin embargo, no se observan diferencias significativas respecto a la carga parasitaria de ambos grupos (Tabla 20b).

Cabe comentar respecto a esta variable, que en la encuesta se consideraron animales que usaban pipeta a aquellos que la habían utilizado durante el último periodo de actividad de los vectores. Muchos de los propietarios encuestados, proporcionan a su mascota prevención durante todo el año, pero no podemos asegurar con certeza que todos los propietarios que contestaron afirmativamente a este respecto aplicasen correctamente las pipetas dentro de los intervalos de tiempo aconsejados en función de su efectividad (1 vez al mes)

Tabla 20b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificadas según el uso de pipeta

Pipeta	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
No	12	82,41 $\pm$ 68,09	35,42 $\pm$ 1,52
Si	45	71,68 $\pm$ 88,25	35,81 $\pm$ 1,48
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
P		0,698 <sup>t</sup>	0,421 <sup>t</sup>

<sup>t</sup> Significación estadística según prueba t de Student

A diferencia del caso anterior, cuando estimamos las prevalencias en función del uso de collares impregnados con Deltametrina (Tabla 21a), no se observaron variaciones significativas teniendo en cuenta esta variable; sin embargo hay estudios que demuestran la efectividad de estos collares, y su influencia en la disminución de la seroprevalencia (Killick-Kendrick et al, 1997)

Consideramos que generalmente el uso de los collares para la prevención de las picaduras no es bueno. La razón principal es que un elevado porcentaje de los propietarios no coloca adecuadamente el collar, pues es frecuente que estos vayan relativamente sueltos y no contacten con la piel. Además la casa comercial estima la duración de la efectividad de dichos collares en 6 meses, por tanto en el caso de propietarios que comprasen su collar en Febrero-Marzo, época en que se finaliza la campaña de diagnóstico, estos collares perderán efectividad en los meses de Agosto-Septiembre, época en que aún sigue activo el flebotomo (Galvez, Descalzo et al, 2010). Un estudio realizado por Manzanillo y cols. (2006) cita que la tasa de protección acumulada estimada teniendo en cuenta los 2 años de su estudio es del 50,8% por lo que aunque estos collares ofrecen cierta protección, realmente no es muy alta.



Tabla 21a. Prevalencias estratificadas según el uso de collar

Collar	N	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
No	45	6,7%	2,29-17,86%	64,4%	49,89-76,78%
Si	53	9,4%	4,10-20,25%	52,8%	39,66-65,62%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
p		0,723 <sup>F</sup>		0,306 <sup>F</sup>	

<sup>F</sup> Significación estadística según prueba exacta de Fisher

Al igual que en el caso de las prevalencias, las cargas parasitarias mostradas en la Tabla 21b, no difieren entre los animales en función de si usan o no collares. Esto refuerza nuestra hipótesis de que no están siendo efectivos por fallos en la colocación.

Tabla 21b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificadas según el uso de collar

Collar	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
No	29	65,69 $\pm$ 71,36	35,80 $\pm$ 1,50
Si	28	82,48 $\pm$ 95,87	35,65 $\pm$ 1,49
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
p		0,455 <sup>t</sup>	0,702 <sup>t</sup>

<sup>t</sup> Significación estadística según prueba t de Student

Estudiamos los hábitos del animal, para ver qué influencia pueden tener estas variables sobre la parasitación. Se constata que los animales más expuestos durante los horarios de actividad de los vectores (paseos durante la tarde y el anochecer) (Killick-Kendrick 1999) presentan prevalencias por qPCR significativamente mayores ( $p=0,035$  y  $p=0,036$  respectivamente). También observamos mayores prevalencias por IFI aunque estas no muestran una significación estadística (Tabla 22a).

Tabla 22a. Prevalencias estratificadas según hora de paseo

Horario	Pasea	n	IFI		qPCR (CT<38)	
			Prev.	p	Prev.	p
Amanecer	Sí	60	11,7%	0,146 <sup>F</sup>	55%	0,425 <sup>C</sup>
	No	38	2,6%		63,2%	
Mañana	Sí	79	8,9%	>0,999 <sup>F</sup>	60,8%	0,288 <sup>C</sup>
	No	19	5,3%		47,4%	
Tarde	Sí	77	10,4%	0,196 <sup>F</sup>	63,6%	0,035 <sup>C</sup>
	No	21	0%		38,1%	
Anochecer	Sí	81	9,9%	0,344 <sup>F</sup>	63%	0,036 <sup>C</sup>
	No	17	0%		35,3%	
Noche	Sí	72	9,7%	0,677 <sup>F</sup>	54,2%	0,182 <sup>C</sup>
	No	26	3,8%		69,2%	
<b>Total</b>		<b>98</b>	<b>8,2%</b>		<b>58,2%</b>	

<sup>F</sup> Significación estadística según prueba exacta de Fisher. <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

Sin embargo al analizar las cargas parasitarias de estos animales no presentaron diferencias significativas según los hábitos de paseo (Tabla 22b).

Tabla 22b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificadas según horario de paseo

Horario	qPCR (CT<38)		qPCR		CT	
	Pasea	n	X ± SD	p	X ± SD	p
Amanecer	Si	33	73,82 ± 86,66	0,566 <sup>MW</sup>	35,65 ± 1,47	0,644 <sup>t</sup>
	No	24	74,11 ± 81,93		35,48 ± 1,53	
Mañana	Si	48	69,37 ± 72,12	0,939 <sup>MW</sup>	35,77 ± 1,53	0,698 <sup>t</sup>
	No	9	98,33 ± 134,13		35,55 ± 1,65	
Tarde	Si	49	76,12 ± 88,04	0,761 <sup>MW</sup>	35,69 ± 1,50	0,629 <sup>t</sup>
	No	8	60,63 ± 53,93		35,97 ± 1,45	
Anochecer	Si	51	73,19 ± 72,56	0,048 <sup>MW</sup>	35,65 ± 1,42	0,219 <sup>t</sup>
	No	6	80,33 ± 162,01		36,44 ± 1,98	
Noche	Si	39	68,69 ± 73,82	0,938 <sup>MW</sup>	35,73 ± 1,39	0,998 <sup>t</sup>
	No	18	85,32 ± 104,12		35,73 ± 1,71	
Total	57		73,94 ± 83,96		35,73 ± 1,48	

<sup>MW</sup> Significación estadística según prueba U de Mann Whitney. <sup>t</sup> Significación estadística según prueba t de Student

La siguiente variable a considerar en relación con los hábitos de manejo de los animales, es la estancia en lugares que favorezcan la exposición al vector. Así la Tabla 23a nos muestra que los animales que pasan periodos del año en guarderías (en todos los encuestados estas guarderías estaban en la provincia de Zaragoza y mayoritariamente en el área de Miralbueno) presentan mayores prevalencias en qPCR con una significación estadística de  $p=0,043$ , y por PCR aun no siendo significativo podemos observar que dentro de los animales que realizan estancias en guarderías el porcentaje de seropositivos es mayor al doble de los que no.

Tabla 23a Prevalencias estratificadas según estancias

Estancia	Asiste	n	IFI		PCR (CT<38)	
			Prev.	p	Prev.	p
Mediterráneo	Sí	31	0%	0,053 <sup>F</sup>	58,1%	0,989 <sup>C</sup>
	No	67	11,9%		58,2%	
Guardería	Sí	30	13,3%	0,244 <sup>F</sup>	73,3%	0,043 <sup>C</sup>
	No	68	5,9%		51,5%	
Otra	Sí	6	0,0%	>0,999 <sup>F</sup>	50,0%	0,676 <sup>C</sup>
	No	92	8,7%		58,7%	
<b>Total</b>		<b>98</b>	<b>8,2%</b>		<b>58,2%</b>	

<sup>F</sup> Significación estadística según prueba exacta de Fisher. <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

Sin embargo cuando estudiamos la carga parasitaria reflejada en la Tabla 23b, no encontramos diferencias entre los animales que realizan estancias en guarderías.

Sin embargo observamos que los animales que realizan estancias en zonas del área del Mediterráneo presentan una carga parasitaria significativamente menor a los que no.

Tabla 23b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificadas según estancias

Estancia	qPCR (CT<38)		qPCR		CT	
	Asiste	n	X $\pm$ SD	p	X $\pm$ SD	p
Mediterráneo	Si	18	33,78 $\pm$ 26,55	0,001 <sup>t</sup>	36,57 $\pm$ 1,09	0,003 <sup>t</sup>
	No	39	92,48 $\pm$ 94,64		35,34 $\pm$ 1,49	
Guardería	Si	22	94,58 $\pm$ 103,65	0,143 <sup>t</sup>	35,35 $\pm$ 1,61	0,129 <sup>t</sup>
	No	35	60,97 $\pm$ 67,28		35,97 $\pm$ 1,37	
Otra	Si	3	185,00 $\pm$ 154,82	0,217 <sup>MW</sup>	34,64 $\pm$ 2,37	0,192 <sup>t</sup>
	No	54	67,77 $\pm$ 76,21		35,74 $\pm$ 1,43	
<b>Total</b>	<b>57</b>		<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>		<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>	

<sup>MW</sup> Significación estadística según prueba U de Mann Whitney, <sup>t</sup> Significación estadística según prueba t de Student

Por último dentro de este apartado, estudiamos la relación entre el tipo de alojamiento de los animales y las prevalencias observadas (Tabla 24a). Tanto en IFI como en qPCR se observan prevalencias mayores entre los animales que viven en el exterior y por tanto han tenido mayor exposición al vector. En caso del IFI presenta diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,020$ ), y para qPCR se observa una tendencia estadística ( $p=0,070$ ).

Tabla 24a. Prevalencias estratificadas según el tipo de alojamiento.

Alojamiento	n	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
Interior	64	3,1%	0,86-10,7	48,4%	36,63-60,42%
Exterior	34	17,6%	8,35-33,51	76,5%	60,00-87,56%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
p		0,020 <sup>F</sup>		0,070 <sup>C</sup>	

<sup>F</sup> Significación estadística según prueba exacta de Fisher, <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-Cuadrado

La Tabla 24b nos muestra las cargas parasitarias de los animales positivos en función de su tipo de alojamiento, y aun no siendo estadísticamente significativo, podemos observar que los animales que viven en el exterior tienen una mayor carga parasitaria que los alojados en el interior.

Tabla 24b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificadas según el tipo de alojamiento.

Alojamiento	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
Interior	31	66,32 $\pm$ 89,00	36,01 $\pm$ 1,41
Exterior	26	83,02 $\pm$ 78,27	35,40 $\pm$ 1,52
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>73,94 <math>\pm</math> 83,96</b>	<b>35,73 <math>\pm</math> 1,48</b>
p		0,459 <sup>t</sup>	0,122 <sup>t</sup>

<sup>t</sup> Significación estadística según prueba t de Student

### 5.3.3. Asociación signos clínicos

Aunque partimos de una muestra de 98 animales asintomáticos, sin detecciones previas positivas frente a *L. infantum*, se recogió información relacionada con algunos de los principales signos clínicos de la enfermedad (Solano-Gallego et al, 2011).

La Tabla 25 muestra los porcentajes de animales con los diferentes grados de linfadenomegalia para los linfonodos submandibulares, preescapulares y poplíteos. Al centrar nuestro estudio en animales asintomáticos la mayoría de estos presentan un tamaño que consideramos normal o no detectables. No obstante, un pequeño porcentaje (11,2%) presenta los linfonodos poplíteos ligeramente aumentados; un 7,1% presenta un ligero aumento en los ganglios submandibulares, lo cual también podría achacarse a patologías dentales frecuentes en la clínica (sarro, gingivitis) y tan solo un 1% presentaron unos ganglios severamente aumentados. El animal que concretamente presentó este signo, corresponde con una qPCR positiva y una carga considerada alta con una CT=34,28.

Tabla 25. Frecuencia de linfadenopatías

Linfonodos	Ausentes	Normales	Ligeramente Aumentados	Severamente Aumentados
Submandibulares	53,1%	38,8%	7,1%	1%
Preescapulares	96,9%	3,1%	0%	0%
Poplíteos	26,6%	61,2%	11,2%	0%

Aparte de la exploración referente a los linfonodos, se recogió información sobre la presencia de otros signos compatibles con la enfermedad, como son alopecias, úlceras, diarreas y cojeras. En la Tabla 26 observamos que la mayor parte de la muestra no presenta tales signos.

Tabla 26. Frecuencia de distintos signos clínicos

Signos	Ausente	Leve	Severa
Alopecias	95,9%	4,1%	0%
Úlceras	98%	2%	0%
Diarreas	84,7%	11,2%	4,1%
Cojeras	87,7%	14,3%	3,1%

Por último en cuanto a este respecto, recogimos información referente a la condición corporal de los animales (Tabla 26), donde se muestra que más de las tres cuartas partes de la muestra tenían un peso considerado normal para su raza, un 15% mostraban sobrepeso y tan solo un 2% fueron obesos. Sin embargo la importancia de la condición corporal en relación con esta enfermedad se encuentra en su capacidad caquetizante, y en este aspecto solo encontramos un 4% de los animales con una condición de delgados (Solano-Gallego et al, 2011).

Tabla 27. Distribución de la muestra en función de la condición corporal

Condición Corporal	%
Caquexia	0,0%
Delgado	4,1%
Normal	78,6%
Sobrepeso	15,3%
Obeso	2,0%

Para estudiar la posible relación entre estos signos clínicos y la prevalencia de los animales, creamos un índice que agrupaba los datos previamente citados y que nos permitió clasificar a los animales en tres categorías según la sintomatología: 0 (animales con signos ausentes y normales), 1 (signos leves) y 2 (signos severos). Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas, si que podemos apreciar en la Tabla 28a que a mayor sintomatología, mayor prevalencia.

Tabla 28a. Distribución de positivos estratificada por la sintomatología

Síntomas	n	IFI		qPCR (CT<38)	
		Prev.	IC (95%)	Prev.	IC (95%)
0	47	4,3%	1,17-14,25%	57,4%	43,28-70,49%
1	38	10,5%	4,17-24,13%	57,9%	42,19-72,15%
2	13	15,4%	4,33-42,24%	61,5%	35,52-82,29%
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>8,16%</b>	<b>4,19 - 15,29%</b>	<b>58,2%</b>	<b>48,27 - 67,44%</b>
p		0,343 <sup>LR</sup>		0,965 <sup>C</sup>	

<sup>LR</sup> Significación estadística según Razón de Verosimilitudes; <sup>C</sup> Significación estadística según prueba Chi-cuadrado de Pearson

En cuanto a la carga parasitaria, no podemos observar diferencias en función de los principales signos clínicos (Tabla 28b). Esta es una enfermedad inmunitaria, y los signos clínicos están relacionados con la presencia de anticuerpos, más que con la carga parasitaria. El sistema inmune de cada individuo reacciona de modo distinto a mismas cargas parasitarias, por tanto cuando nos encontramos con animales asintomáticos y cargas medias o bajas, no podemos asociar estos parámetros.

Sin embargo cabe comentar que este estudio se ha centrado en una población asintomática; en estudios recientes que incluían animales con sintomatología evidente con LC se ha encontrado esta relación (Tabar et al, 2009).

Cabe comentar que la sintomatología tampoco se ha visto relacionada con la picadura del vector (Molina et al, 1994), por tanto los animales asintomáticos son igualmente infectados por los flebótomos, lo cual coincide con el hecho de que muestren cargas parasitarias similares (Tabla 28b).

Tabla 28b. Cargas parasitarias (media  $\pm$  SD) estratificadas estratificada por la sintomatología

Síntomas	qPCR (CT<38)	qPCR	CT
0	27	66,37 $\pm$ 92,69	35,91 $\pm$ 1,49
1	22	79,59 $\pm$ 83,49	35,65 $\pm$ 1,57
2	8	83,96 $\pm$ 56,02	35,33 $\pm$ 1,27
Total	57	73,94 $\pm$ 83,96	35,73 $\pm$ 1,48
P		0,286 <sup>KW</sup>	0,596 <sup>A</sup>

<sup>KW</sup> Significación estadística según Kruskal-Wallis; <sup>A</sup> Significación estadística según ANOVA

## 6. Conclusiones

---

En base a las condiciones de este estudio hemos llegado a las siguientes conclusiones:

PRIMERA. La prevalencia de infección por *Leishmania infantum* se está subestimando sistemáticamente al utilizar pruebas serológicas, y debería plantearse la utilización de la qPCR como herramienta de diagnóstico precoz y de evaluación de la parasitemia, como indicador cuantitativo de infección en el cual basar las medidas preventivas frente a la enfermedad.

SEGUNDA. Al trabajar sobre una población asintomática de características uniformes sólo se observó que la edad estaba relacionada con la infección, y no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el resto de variables intrínsecas del animal que se describen en otros trabajos, lo que podría deberse a sesgos en la recogida de las muestras.

TERCERA. La exposición al vector es el factor más importante relacionado con la infección por *Leishmania*, lo que nos permite elaborar estrategias de prevención basados en distintos factores: evitar los paseos durante la tarde y el anochecer, utilizar pipetas repelentes y limitar la permanencia del perro en el exterior.





## 7. Bibliografía

---

1. Acedo-Sanchez C, Martin J, Velez D, Sanchis MC, Louassini M, Maldonado JA, Morillas F. Leishmaniasis Eco-epidemiology in the Alpujarra Region (Granada province, southern Spain) *Int J Parasitol.* 1996; 26: 303-10.
2. Aoun O, Mary C, Roqueplo C, Marié JL, Terrier O, Levieuge A, Davoust B. Canine Leishmaniosis in south-east of France: Screening of *Leishmania infantum* antibodies (western blotting, ELISA) and parasitaemia levels by PCR quantification. *Vet Parasitol.* 2009; 166: 27-31.
3. Ashford RW, Snowden KF. Dogs and protozoan zoonoses. En: Macpherson C, Meslin F, Wandeler A (eds). *Dogs, zoonoses and public health.* Wallingford, UK: Cab international. 2000; 5: 132-40.
4. Baneth G, Shaw S. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2002; 106: 315-324.
5. *Canileish European Registration Dossier: study F-136.010000-58060.*
6. Castillo Hernández JA, Sánchez Acedo C, Gutiérrez Galindo JF, Lucientes Curdi J, Estrada Peña A, Galmés Femenias M. Estudio epidemiológico de La leishmaniosis canina en la provincia de Zaragoza. Resúmenes IV. Congreso Nacional de Parasitología. Tenerife, 1985; 31.
7. Cortadellas O, Fernández del Palacio MJ, Talavera J, Bayón A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2008;22(2):293-300.
8. Cortes S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L, Campino L. Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol.* 2012 (en prensa)
9. Costa CH. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis? A critical evaluation of the science, politics and ethics behind this public health policy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(2):232-42.
10. Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* 2002; 30;359(9312):1124-5.
11. Daniel WW. *Biostatistics: A foundation for analysis in health sciences* (7th edition). Wiley Series in probability and statistics. John Wiley & Sons, Inc. Singapur. 2000; 755 pp.
12. De Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol.* 2006; 15;137(1-2):159-67.
13. Denerolle P, Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med.* 1999; 13, 413-5.

14. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004; 27: 305-18.
15. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. *Veterinary epidemiologic research.* AVC Inc, Charlottetown, Canada. 2003; 706 pp.
16. Fernandez-Bellon H, Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortés A, Ferrer L, Gallego M, Alberola J, Ramis A. Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. 2008. *Vet Parasitol.* 155: 32-6.
17. Ferroglio E, Poggi M, Triscioglio A. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Pub Health.* 2008; 55(3):145-8.
18. Fernández-Pérez F, Gómez-Muñoz M, Méndez S, Alunda J. *Leishmania* specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop.* 2003; 86: 83-91.
19. Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Triscioglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dogs as compared with immunofluorescence assay and western blot. *Vet Parasitol.* 2007; 144: 162-6.
20. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sanchez A, Roura X. 2006. Advantages of real-timePCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2006; 137: 214-21.
21. Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E, Molina R. Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol.* 2010a; 169:327-34.
22. Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jimenez MI, Nieto J, Martín O, Dos Santos-Brandao F, Guerrero I, Cubero E, Molina R. Seasonal trends and spartial relations between enviromental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.* 2010b; 115: 95-102.
23. Gálvez R, Descalzo MA, Miró G, Jiménez MI, Martín O, Dos Santos-Brandao F, Guerrero I, Cubero R, Molina E. Seasonal trends and spatial relations between environmental/meteorological factors and leishmaniosis sand fly vector abundances in Central Spain. *Acta Trop.* 2010c; 115 (1-2):95-102
24. Garnham PC. The genus *Leishmania*. *Bull World Health Organ.* 1971;44(4):477-89.
25. Gómez-Ochoa P. *Estudio de un nuevo tratamiento de la leishmaniosis canina. Valoración del efecto inmunomodulador de la domperidona.* Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria 2004.
26. Gradoni L. The diagnosis of canine Leishmaniasis. En: *From canine Leishmaniasis; an update.* Proceedings of a canine Leishmaniasis. Forum, 2002.
27. Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J.* 2009; 179(2): 259-63.

28. Gomez-Ochoa P, Castillo JA, Lucientes J, Gascon M, Zarate JJ, Arbea JI, Larraga V, Rodriguez C. Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10(5): 967-8.
29. Halbig P, Hodjati MH, Mazloumi-Gavvani AS, Mohite H, Davies CR. Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med Vet Entomol*. 2000; 14(2):223-6.
30. Hiepe T, Lucius R, Gottstein B. Capítulo 6. Principios de la biología de los parásitos. En: *Parasitología general con principios de inmunología, diagnóstico y lucha antiparasitaria*. Ed. Acribia. Zaragoza, 2006a: 115-7.
31. Hiepe T, Lucius R, Gottstein B. Capítulo 8. Aspectos inmunológicos de las infestaciones parasitarias. En: *Parasitología general con principios de inmunología, diagnóstico y lucha antiparasitaria*. Ed. Acribia. Zaragoza, 2006b: 280-5
32. Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP, Cadiergues MC. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*. 1997; 11(2):105-11.
33. Killick-Kendrick R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. *Clin Dermatol*. 1999;17:279-289.
34. Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2001; 98(4):247-61.
35. Lachaud L, Chabbert E, Dubbesay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. *J Clin Microbiol*. 2001; 613-7.
36. Lamothe J. Some remarks about the LeishVet directions for the treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2010; 169:416-7.
37. Levine ND, Corliss JO, Cox PEG. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*, 1980; 27: 37-58.
38. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky S, Darnell J. Técnicas de genética molecular y genómica. En: *Biología Celular y Molecular*. (5ª Edición) Ed. Panamericana. Nueva York; 2005; cap 9: 351-402.
39. Lucientes L, Palmer J, Guarga JL, Gracia MJ, Peribanez MA, Zarate J, Castillo JA. Risk of transmission of canine leishmaniosis in eastern Spain. *Vet Rec*. 2005; 156: 743-4.
40. Lucientes J, Benito MI, Castillo JA, Orcajo J. Seasonal dynamics of *Larroussius* species in Aragon (N.E. Spain). *Parassitologia*. 1991; 33:381-6.
41. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*. 2008; 158: 274-87.
42. Maia C, Cristóvão J, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*. 2009; 179(1): 142-4.

43. Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C. Leishmania DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann N Y Acad Sci.* 2008a; 1149:358-60.
44. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino A. Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J.* 2008b; 177: 279-82.
45. Manzillo VF, Oliva G, Pagano A, Manna L, Maroli M, Gradoni L. Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: Evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of Leishmania infection in kennelled stray dogs. *Vet Parasitol.* 2006; 142: 142-5.
46. Maroli M, Mizzoni V, Siragusa C, D'Orazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol.* 2001; 15: 358-363.
47. Martinez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L. Canine Leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors.* 2011; 4: 57.
48. Mencke N, Volf P, Volfova V, Stanneck D. Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol Res.* 2003; 90: Supl 3: 108-11.
49. Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol.* 2007; 147(1-2):67-76.
50. Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit Vectors.* 2012; 27(5):60.
51. Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol.* 2009; 20(5-6):397-404.
52. Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis - neur concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008; 24(8): 371-7.
53. Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol.* 2007; 143(3-4):375-9.
54. Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88(4):491-3.
55. Morales-Yuste M, Morillas-Marquez F, Diaz-Saez V, Barón-Lopez S, Acedo-Sanchez C, Martin-Sanchez J. Epidemiological implications of the use of various methods for

- diagnosis of canine leishmaniasis in dogs with different characteristics and in differing prevalence scenarios. *Parasitol Res.* 2012; DOI: 10.1007/s00436-011-2812-7
56. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(5): 1666-9.
  57. Nicolas L, Sidjanski S, Colle JH, Milon G. *Leishmania major* Reaches Distant Cutaneous Sites Where It Persists Transiently while Persisting Durably in the Primary Dermal Site and Its Draining Lymph Node: a Study with Laboratory Mice. *Infect Immun.* 2000; 68(12): 6561-6.
  58. Otranto D, de Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, Dantas-Torres F, Latrofa S, Diniz PP, Mencke N, Maggi RG, Breitschwerdt E, Capelli G, Stanneck D. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Vet Parasitol.* 2010; 172(3-4):323-32.
  59. Paiva-Cavalcanti M, Edileuza, Vieira de Souza W, De Miranda Gomes M, Abath F. The development of a real-time PCR assay for quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet J.* 2009; 182: 356-8.
  60. Paiva-Cavalcanti M, Regis-da-Silva CG, Gomes YM. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania infantum* infection: a mini review. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2010. 16(4).
  61. Pearson RD, Joeronimo S, Sousa A. Leishmaniasis. En: Gillespie S, Pearson RD (eds) *Principles and Practice of Clinical Parasitology.* England 2001; pp:287-309.
  62. Peres D, Lamounier D, Lopes I, Nery CE, Martins PE. Short report: Heterogeneity of *Leishmania infantum* chagasi Kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop Hyg.* 2010; 82(5): 819-821.
  63. Peris A. *Estudio seroepidemiológico de la dinámica de infección de Leishmania infantum en poblaciones caninas del valle medio del Ebro.* Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, Facultad de Veterinaria 2010.
  64. Ready P. Leishmaniasis emergence in Europe. *Eurosurveill.* 2010; 15(10):pii=19505
  65. Reithinger R, Quinnell R, Alexander B, Davies C. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using an Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(7): 2352-6.
  66. Rodriguez-Cortes A, Ojeda A, Francino O, Lopez-Fuertes L, Timón M, Alberola J. *Leishmania* infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard” *Am J Trop Hyg.* 2010; 82(2): 251-6.
  67. Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Brit Med J,* 1903; 2: 1261-2.
  68. Sanmartin Durán ML. *Avances en Parasitología. Protozoología.* USC (Ed) Universidad Santiago de Compostela, 1992.

69. Silva F, Oliveira R, Silva T, Xavier M, Nascimento E, Santos R. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009; 160: 55-9.
70. Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L. A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(4):400-1.
71. Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 560-3.
72. Solano-Gallego L, Rodríguez-Cortés A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2007; 147: 315-9.
73. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneths G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009; 165: 1-18.
74. Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneths G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Paras Vectors.* 2011; 4: 86.
75. Sousa S, Lopes AP, Cardoso L, Silvestre R, Schallig H, Reed SG, Cordeiro da Silva A. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. *Acta Trop.* 2011; 120(1-2):82-7
76. Tabar MD, Francino O, Altet L, Sánchez A, Ferrer L, Roura X. PCR survey of vectorborne pathogens in dogs living in and around Barcelona, an area endemic for leishmaniasis. *Vet Record.* 2009; 164: 112-6.
77. Thrusfield M. *Veterinary Epidemiology* (3<sup>rd</sup> edition). Blackwell Science, Oxford, UK. 2007; 610 pp.
78. Tizard I. *Inmunología Veterinaria*. (6<sup>a</sup> Edición). Mc Graw- Hills, Philadelphia, USA, 2000; 28:207-26.
79. Torres M, Bardagí M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniasis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J.* 2011; 188: 346-51.
80. Vandesompele J. *qPCR guide*. Eurgentec. 2009; 62 pp.
81. Vasquez L. Terapeutica antileishmania: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gac Med Caracas.* 2009;117(2): 93-111.
82. WHO. *Control of leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis*, 22-26 Marzo 2010. WHO Technical Report Series nº 949. Geneva. 2010; 1-186.
83. Wilson EB. Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *J the Am Stat Assoc.* 1927; 22(158): 209-12.

84. Winker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, Bastien P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucl Acids Res.* 1996; 24 (9): 1688-94.
85. Zarlenga D, Higgins J. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. *Vet Parasitol.* 2001; 101: 215-30.





## Encuesta epidemiológica en soporte papel

Nº encuesta:    Fecha:     
Día Mes Año Nº referencia:

Edad	Sexo	Aptitud	Longitud del pelo	Color de la capa
<input type="checkbox"/> 1-5 años	<input type="checkbox"/> Macho	<input type="checkbox"/> Compañía	<input type="checkbox"/> Corto	<input type="checkbox"/> Claro
<input type="checkbox"/> 6-10 años	<input type="checkbox"/> Hembra	<input type="checkbox"/> Guarda	<input type="checkbox"/> Medio	<input type="checkbox"/> Intermedio
<input type="checkbox"/> >10 años	<input type="checkbox"/> Esterilizado		<input type="checkbox"/> Largo	<input type="checkbox"/> Oscuro

Peso:  kg

Raza:

Residencia	Tratamientos antimosquitos	Estancias temporales	Horarios de paseo
<input type="checkbox"/> Garrapinillos	<input type="checkbox"/> Collar	<input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Amanecer
<input type="checkbox"/> Autovía Logroño	<input type="checkbox"/> Pipeta	<input type="checkbox"/> Mediterráneo	<input type="checkbox"/> Mañana
<input type="checkbox"/> Miralbueno-Oliver	<b>Alojamiento</b>	<input type="checkbox"/> Guardería	<input type="checkbox"/> Tarde
<input type="checkbox"/> Valdefierro	<input type="checkbox"/> Interior	<input type="checkbox"/> Otras	<input type="checkbox"/> Anochecer
<input type="checkbox"/> Bombarda-Hispanidad	<input type="checkbox"/> Exterior		<input type="checkbox"/> Noche
<input type="checkbox"/> Montecanal			

## Observaciones

\_\_\_\_\_

### Palpación linfonodos

-	+	++	+++

- Submaxilares
- Supraescapulares
- Poplíteos

### Signos clínicos

-	+	++

- Alopecia
- Úlceras cutáneas
- Cojeras
- Diarreas <1 mes

## Observaciones


### Condición corporal

	Caquético
	Delgado
	Normal
	Sobrepeso
	Obeso

### Diagnóstico

IFI	
qPCR	

## Encuesta epidemiológica en soporte informático (Microsoft Access 2003)

Encuesta		Id	#####	Nº de referencia	Fecha	Nº de encuesta
Edad	<input type="text"/>	Sexo	<input type="text"/>	Aptitud	<input type="text"/>	Longitud del pelo <input type="text"/>
Peso	<input type="text"/>	Raza	<input type="text"/>	Color de la capa	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Residencia	<input type="text"/>	Pipetas	<input type="checkbox"/>	Paseo amanecer	<input type="checkbox"/>	
Alojamiento	<input type="text"/>	Collar	<input type="checkbox"/>	Paseo mañana	<input type="checkbox"/>	
Estancias	<input type="text"/>	Protección todo el año	<input type="checkbox"/>	Paseo tarde	<input type="checkbox"/>	
		Paseo atardecer	<input type="checkbox"/>	Paseo Noche	<input type="checkbox"/>	
OBSERVACIONES						
<input type="text"/>						
Linfonodos Submaxilares	<input type="text"/>	Alopecia	<input type="text"/>	IFI	<input type="text"/>	
Linfonodos Supraescapulares	<input type="text"/>	Úlceras cutaneas	<input type="text"/>	qPCR	<input type="text"/>	
Linfonodos Popliteos	<input type="text"/>	Cojeras	<input type="text"/>			
Condición corporal	<input type="text"/>	Diarrreas último mes	<input type="text"/>			

Registro: 14 99 de 99 Sin filtro Buscar